

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA Y NEUROCIENCIA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Contribución de la regulación del receptor de neurotrofinas

TrkB a la muerte neuronal en isquemia cerebral

TESIS DOCTORAL

Gonzalo Sánchez Tejeda

Licenciado en Biología

Directora:

Dra. Margarita Díaz-Guerra González

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid
CSIC-UAM



Dña. **Margarita Díaz-Guerra González**, Doctora en Ciencias e Investigador Científico del CSIC en el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” de Madrid (CSIC-UAM).

CERTIFICA:

Que Don **Gonzalo Sánchez Tejeda**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título:

Contribución de la regulación del receptor de neurotrofinas TrkB a la muerte neuronal en isquemia cerebral

CONSIDERA, además, que el mencionado trabajo reúne la originalidad y calidad científica requeridas para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en,

Madrid, 11 de Noviembre de 2014

Fdo.: Margarita Díaz-Guerra González

Investigador Científico del CSIC
Profesora Honoraria Dpto. Bioquímica UAM

La realización de esta Tesis doctoral no hubiera sido posible sin el apoyo y colaboración de un gran número de personas a las que estoy profundamente agradecido. En especial a la Dra. Margarita Díaz-Guerra, directora de esta investigación, por acogerme en su laboratorio, por su orientación y supervisión continua del trabajo, y sobre todo por el entusiasmo, optimismo y motivación mostrados a lo largo de estos años. Especial reconocimiento merecen también todos los compañeros con los que he compartido laboratorio puesto que sin su inestimable ayuda no podría haber finalizado esta Tesis (Sara Mederos, Sara González, Mónica, Selene, etc.). Me gustaría destacar a Óscar porque su investigación previa es la base sobre la que se asienta el trabajo aquí presentado, a Raquel por haber participado activamente en una gran cantidad de los experimentos, y sobre todo a Sara Ayuso, que además de haber colaborado en toda la parte in vivo, ha supuesto un enorme apoyo tanto a nivel profesional como personal. También me gustaría agradecer a la Dra. Teresa Iglesias y a todas las chicas de su equipo (Celia, Andrea, Lucía G., Lucía S., Ana, Julia, etc.) por la ayuda recibida y sus interesantes aportaciones para el desarrollo de este trabajo. De igual forma me gustaría dar las gracias al Dr. Jaime Renart y al Dr. José Miguel Cosgaya por los reactivos cedidos y que tan útiles nos han sido, y al Dr. Joan Montaner y su equipo por las muestras proporcionadas. Querría también expresar mi gratitud hacia todas aquellas personas que han contribuido de una manera u otra en mi formación. Finalmente, un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos. A todos ellos, muchas gracias.

La señalización neurotrófica mediada por los receptores TrkB es crítica en el funcionamiento y supervivencia neuronales. En isquemia cerebral se produce un desbalance de las principales isoformas de este receptor expresadas en neuronas, la isoforma catalíticamente activa TrkB *full length* (TrkB-FL) y la truncada TrkB-T1 que carece del dominio tirosina quinasa. Este desajuste es consecuencia de diversos mecanismos inducidos en excitotoxicidad: la inversión del patrón transcripcional del gen *Ntrk2*, que favorece la expresión de TrkB-T1 sobre TrkB-FL, y el procesamiento por calpaína de TrkB-FL en regiones próximas a su Y515, que genera un receptor truncado similar a TrkB-T1 y un fragmento intracelular con el dominio tirosina quinasa intacto. En esta Tesis hemos demostrado la existencia de un tercer mecanismo consistente en la proteólisis por metaloproteinasas del dominio extracelular de TrkB-FL y TrkB-T1, resultando en la liberación de su ectodominio al medio extracelular donde podría unir BDNF y reducir su disponibilidad. El fragmento C-terminal de TrkB-T1, al contrario de lo que ocurre con el generado de TrkB-FL, es procesado ulteriormente en su zona intramembrana por γ -secretasas que desprenden su pequeño dominio intracelular hacia el citosol. Estas alteraciones de la vía BDNF/TrkB producidas en condiciones patológicas contribuyen activamente a la muerte neuronal, por lo que su mantenimiento constituye una estrategia potencial para el tratamiento en isquemia cerebral y numerosas patologías con un componente excitotóxico. Concretamente, en este trabajo hemos desarrollado péptidos con el receptor TrkB como diana que, al contener la secuencia transactivadora de la proteína Tat del VIH, son permeables a la membrana plasmática y tienen potencial para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). En condiciones de excitotoxicidad, el péptido TFL₄₅₇ es capaz de prevenir la degradación proteolítica de TrkB-FL y preservar un receptor que mantiene la fosforilación en su residuo Y816, mientras que T1 interfiere las rutas de señalización de TrkB-T1 y podría contrarrestar el efecto producido por el incremento de esta isoforma en excitotoxicidad. Ambas aproximaciones han demostrado efecto neuroprotector frente a la muerte neuronal excitotóxica, revelándose como prometedoras herramientas terapéuticas. Finalmente, hemos comprobado que los fragmentos derivados del procesamiento de TrkB son capaces de difundir a la sangre y al líquido cefalorraquídeo (LCR) en modelos animales de isquemia cerebral, por lo que podrían constituir novedosos biomarcadores para predecir el curso de esta enfermedad.

Neurotrophin signaling through TrkB receptors is essential for neuronal function and survival. Ischemic stroke causes an imbalance of the main isoforms of this receptor expressed in neurons: catalytic isoform TrkB *full length* (TrkB-FL) and truncated TrkB-T1 lacking the tyrosine kinase domain. This dysregulation is the consequence of several mechanisms induced in excitotoxicity: inversion of the *Ntrk2* gene transcriptional pattern, which favors TrkB-T1 expression over TrkB-FL, and calpain processing of TrkB-FL near its Y515 residue, originating a truncated receptor similar to TrkB-T1 and an intracellular fragment which contains the tyrosine kinase domain. In this work we unveil a third mechanism consisting of ectodomain shedding by metalloproteases of TrkB-FL and TrkB-T1 that generates a soluble fragment that could act as a BDNF scavenger. C-terminal fragment of TrkB-T1, but not TrkB-FL, is subsequently cleaved by γ -secretases and releases its short intracellular domain to the cytosol. These BDNF/TrkB alterations contribute to neuronal death in pathological conditions. Therefore, their recoveries constitute a potential strategy to the treatment of ischemic stroke and other pathologies with an excitotoxic component. According to this hypothesis, we develop peptides targeting TrkB receptor that contain HIV Tat transactivator protein, able to cross the blood-brain-barrier and cell membrane. During excitotoxic conditions TFL₄₅₇ peptide is able to prevent the TrkB-FL proteolytic degradation and to preserve the phosphorylation of its Y816 residue. In the other hand TT1 disrupts TrkB-T1 signaling pathways and it could counteract the upregulation effect of this isoform in excitotoxicity. Both approaches have shown neuroprotective effect against excitotoxic neuronal death, revealing themselves as promising therapeutic tools. Finally, we found that TrkB fragments produced by protease activity can diffuse to blood and cerebrospinal fluid of animal models of ischemic stroke. Consequently, they might provide useful biomarkers for monitoring progression of the disease.

ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1. Ictus e isquemia cerebral	9
2. Núcleo y penumbra isquémicos	10
3. Mecanismos patogénicos de la isquemia cerebral	11
4. Excitotoxicidad	12
5. Papel dual de los NMDARs en supervivencia y muerte neuronal	14
6. Nuevas estrategias de neuroprotección basadas en los mecanismos excitotóxicos	16
6.1 Efectores de la señalización excitotóxica que interaccionan con los NMDARs	17
6.2 Efectores de la señalización excitotóxica que modulan la expresión génica	19
6.3 Sustratos de calpaína cuyo procesamiento contribuye a la excitotoxicidad	20
7. Neurotrofinas y sus receptores. Clasificación	22
8. Estructura de los receptores Trk	24
9. Expresión de TrkB en el SNC	25
10. Distribución de TrkB-FL y TrkB-T1 en el SNC de mamíferos	26
11. Activación y vías de señalización de TrkB-FL	26
11.1 Cascada de señalización de MAPK/ERK	27
11.2 Cascada de señalización de PI3K-Akt	27
11.3 Cascada de señalización de PLC γ	28
11.4 Transactivación independiente de neurotrofinas	29
12. Funciones de la isoforma truncada TrkB-T1	29
13. Regulación de TrkB y su señalización: transporte axonal, reciclaje y degradación	31
14. Alteraciones patológicas de la vía BDNF/TrkB	33

14.1	Enfermedad de Alzheimer	33
14.2	Enfermedad de Parkinson	34
14.3	Enfermedad de Huntington	34
14.4	Depresión	35
14.5	Esquizofrenia	35
14.6	Isquemia cerebral	36
15.	Restauración de la vía BDNF/TrkB como herramienta neuroprotectora	36
	OBJETIVOS	39
	MATERIALES Y MÉTODOS	43
1.	Muestras biológicas y su manipulación	45
1.1	Cultivos celulares	45
1.1.1	<i>Cultivos primarios de neuronas corticales de rata</i>	45
1.1.2	<i>Cultivos de células PC12</i>	47
1.1.3	<i>Cultivos de células HEK293t</i>	47
1.1.3.1	<i>Transfección transitoria de células HEK293t</i>	47
1.2	Vectores lentivirales	47
1.2.1	<i>Generación de lentivirus</i>	49
1.2.2	<i>Titulación de las suspensiones lentivirales</i>	50
1.2.2.1	<i>Titulación mediante FACScan</i>	50
1.2.2.2	<i>Titulación mediante RT-PCR cuantitativa</i>	50
1.2.3	<i>Infección de cultivos primarios con lentivirus</i>	51
1.3	Modelos animales de isquemia cerebral	51
1.3.1	<i>Modelo en ratón de isquemia cerebral permanente por fototrombosis</i>	51
1.3.2	<i>Modelo en rata de isquemia por oclusión transitoria de la ACM (MCAO)</i>	52

1.4 Muestras humanas	52
2. Procesamiento y análisis de muestras	53
2.1 Preparación de extractos proteicos	53
2.1.1 Extractos proteicos procedentes de los cultivos celulares	53
2.1.2 Extractos proteicos procedentes de los medios de cultivo	53
2.1.3 Extractos proteicos procedentes de corteza cerebral de ratón	54
2.1.4 Extractos proteicos procedentes de sueros sanguíneos	54
2.2 Western blot (WB)	55
2.3 Inmunoprecipitación	55
2.3.1 Inmunoprecipitación de proteínas presentes en los extractos celulares	55
2.3.2 Inmunoprecipitación de proteínas presentes en los sueros sanguíneos	55
2.4 Ensayo de la viabilidad neuronal	57
2.5 Inmunocitoquímica	58
2.6 Histología cerebral	58
2.6.1 Tinción de Nissl	58
2.6.2 Inmunohistoquímica	59
2.7 Evaluación del volumen del infarto	59
3. Análisis estadístico	59
RESULTADOS	61
1. Caracterización de la regulación del receptor TrkB en un modelo celular de excitotoxicidad	63
2. Caracterización de la regulación del receptor TrkB en un modelo de isquemia cerebral focal permanente	66
3. Identificación de los fragmentos intracelulares de la isoforma TrkB-FL producto de la activación de calpaína en excitotoxicidad	70

4. Estrategias neuroprotectoras dirigidas a prevenir el procesamiento de TrkB-FL por calpaína inducido en condiciones de excitotoxicidad	72
4.1 Herramientas destinadas a la interferencia proteolítica en secuencias en torno al aminoácido 649 de TrkB-FL	72
4.1.1 <i>Generación de un receptor TrkB-FL mutante mediante sustitución de la secuencia putativa de reconocimiento por calpaína</i>	73
4.1.2 <i>Diseño de un péptido con permeabilidad celular basado en la secuencia putativa de reconocimiento por calpaína en torno al aminoácido 649 de TrkB-FL</i>	79
4.2 Herramientas destinadas a la interferencia proteolítica en secuencias yuxtamembrana de TrkB-FL	82
4.2.1 <i>Efecto del péptido TFL₄₅₇ sobre los niveles de TrkB-FL y otras proteínas importantes para la supervivencia neuronal</i>	87
4.2.2 <i>Dosis óptimas de uso del péptido TFL₄₅₇</i>	89
4.2.3 <i>Efecto neuroprotector del péptido TFL₄₅₇ en un modelo celular de daño agudo</i>	90
4.2.4 <i>Mecanismos de señalización implicados en la acción neuroprotectora de TFL₄₅₇</i>	91
4.2.5 <i>Acción de TFL₄₅₇ sobre los mecanismos proteolíticos que actúan sobre TrkB-FL en excitotoxicidad</i>	94
5. Caracterización del procesamiento de TrkB-FL en excitotoxicidad dependiente de metaloproteinasas	96
6. Caracterización del procesamiento de TrkB-T1 en condiciones de excitotoxicidad dependiente de metaloproteinasas y γ-secretasas	101
7. Estrategia neuroprotectora dirigida a contrarestar los efectos del aumento de los niveles de TrkB-T1 en condiciones de excitotoxicidad	105
8. Evaluación del efecto neuroprotector de los péptidos TT1 y TFL₄₅₇ en un modelo de isquemia cerebral focal	109
9. Investigación de posibles biomarcadores de daño neuronal basados en el procesamiento de TrkB inducido en condiciones de excitotoxicidad	111
DISCUSIÓN	115
1. Mecanismos de regulación de los receptores de neurotrofinas TrkB en excitotoxicidad e isquemia cerebral	117

1.1 Acción proteolítica de calpaína sobre la isoforma TrkB-FL	117
1.2 Acción de metaloproteinasas y γ -secretasas sobre los receptores TrkB	120
2. Fragmentos intracelulares resultantes del procesamiento de TrkB como posibles biomarcadores en el ictus	124
3. Exploración de estrategias de neuroprotección basadas en la interferencia del procesamiento por calpaína de TrkB-FL en excitotoxicidad	127
3.1 Sustitución de la secuencia en torno al aminoácido 649 en TrkB-FL	127
3.2 Péptidos dirigidos a la interferencia del procesamiento de TrkB-FL por calpaína	129
4. Péptidos con capacidad neuroprotectora en excitotoxicidad	131
4.1 Péptido TFL ₄₅₇ : interferencia del procesamiento de TrkB-FL por calpaína y metaloproteinasas	131
4.2 Péptido TT1: interferencia de la señalización dependiente de TrkB-T1	135
CONCLUSIONES	139
BIBLIOGRAFÍA	143
ANEXOS	173

CLAVE DE ABREVIATURAS

4E-BP: <i>eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein</i>	ERK1/2: <i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ACV: accidente cerebrovascular	f32: 32 kDa <i>fragment</i>
ACM: arteria cerebral media	f42: 42 kDa <i>fragment</i>
Akt: <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	f74: 74 kDa <i>fragment</i>
BAD: <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>	FITC: isotiocianato de fluoresceína
Bcl-2: <i>B-cell lymphoma 2</i>	FKHRL1: factores de transcripción tipo <i>forkhead</i>
BDNF: <i>brain-derived neurotrophic factor</i>	FL: <i>full-length</i>
BDPs: <i>breakdown products</i>	FOXO: forkhead box O
BHE: barrera hematoencefálica	Frs2: <i>fibroblast receptor substrate-2</i>
C3G: <i>Crk SH3-domain binding GEF</i>	Gab1: <i>GRB2-associated binding protein 1</i>
CaMK: <i>Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase</i>	GPCR: receptor acoplados a proteínas G
CB1R: receptor cannabinoides 1	GPS: <i>group-based prediction system</i>
CMV: <i>cytomegalovirus</i>	Grb2: <i>growth factor receptor bound protein 2</i>
CPPs: <i>cell-penetrating peptides</i>	GSK3β: <i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
CREB: <i>cAMP response element-binding protein</i>	HA: hemaglutinina
CRMP2: <i>collapsin response mediator protein 2</i>	Hrs: <i>hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
Ct: C-terminal	i.p.: intraperitonealmente
CTF: <i>C-terminal fragment</i>	i.v.: intravenosamente
D1R: receptor dopamina 1	ICD: <i>intracytoplasmic domain</i>
DAG: diacilglicerol	IF: inmunofluorescencia
DAPK1: <i>death-associated protein kinase 1</i>	Insig-1: <i>insulin-induced gene-1</i>
DD: dominio de muerte	IP: inmunoprecipitación
dMCAO: oclusión distal de la ACM	IP3: inositol-trifosfato
DMSB: dimetilsuberimidato	JIP: <i>JNK-interacting protein</i>
DTT: ditioneitol	JNK: <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
EGF: <i>epidermal growth factor</i>	KAP: <i>kidney androgen-regulated protein</i>
ELISA: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	KID: <i>kinase insert domain</i>

Kidins220: <i>kinase D-interacting substrate of 220</i>	pCREB: CREB fosforilado
kDa	PDZ: <i>Post-synaptic density-95 / Disc large / Zonula</i>
LCR: <i>líquido cefalorraquídeo</i>	<i>occludens ligand</i>
LTD: depresión a largo plazo	PI3K <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
LTP: potenciación a largo plazo	PLA₂: fosfolipasa A ₂
MAPK: <i>mitogen activated protein kinases</i>	PLCγ: <i>phospholipase-C γ</i>
MCAO: oclusión de la arteria cerebral media	PSD95: <i>postsynaptic density-95 protein</i>
mGLUR1: receptor metabotrópico de glutamato 1	PSSM: <i>position-specific scoring matrix</i>
MKL: <i>multiple kernel learning</i>	PTEN: <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
MMP-9: metaloproteinasa-9	PVO: oclusión de vasos piales
moi: <i>multiplicity of infection</i>	RBF: <i>radial basis function</i>
Msk1: <i>Mitogen and stress-activated protein kinase</i>	RhoGDI: <i>Rho GDP dissociation inhibitor</i>
mTOR: <i>mammalian Target of Rapamycin</i>	RIP: proteólisis intramembrana regulada
NCX: intercambiador sodio-calcio	RNS: especies reactivas de nitrógeno
NFκB: factor nuclear κB	ROCK: <i>Rho-associated kinases</i>
NGF: <i>Nerve growth factor</i>	ROS: especies reactivas de oxígeno
NHE5: <i>Na⁺ / H⁺ exchanger 5</i>	Rsk: <i>Ribosomal protein S6 kinase</i>
NMDA: N-metil-D-aspartato	SDS: dodecil sulfato sódico
NMDAR: receptor de glutamate tipo NMDA	Shc: <i>Src homology 2 domain containing</i>
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal	Shp-2: <i>Src homology-2 domain-containing phosphatase-2</i>
NO: óxido nítrico	SNC: sistema nervioso central
NRIF: <i>neurotrophin receptor interacting factor</i>	SNP: sistema nervioso periférico
NSE: enolasa específica neuronal	SOS: <i>son of sevenless</i>
Nt: N-terminal	Src: <i>v-src Rous sarcoma viral oncogene homolog</i>
NT-3: <i>Neurotrophin-3</i>	SREBP1: <i>sterol regulatory element binding protein-1</i>
NT-4: <i>Neurotrophin-4</i>	STEP: <i>striatal-enriched protein tyrosin phosphatase</i>
p75^{NTR}: <i>p75 neurotrophin receptor</i>	

SVM: *support vector machine*

T/A: temperatura ambiente

TK: dominio tirosina quinasa

TM: dominio transmembrana

TNF: *tumor necrosis factor*

tPA: activador tisular del plasminógeno

TrkB: *Tropomyosin-related kinase B*

TRPC6: *canonical transient receptor potential
channel 6*

TTC: cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

VDCCs: canales de calcio dependientes de
voltaje

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

WB: *Western Blot*

INTRODUCCIÓN

1. Ictus e isquemia cerebral

El ictus o accidente cerebrovascular (ACV) constituye la segunda causa de mortalidad a nivel mundial después de las enfermedades cardiovasculares, con más de 6 millones de defunciones al año (Organización Mundial de la Salud, 2012), y es uno de los responsables primordiales de demencia e invalidez permanente en personas adultas. Además, el incremento de la esperanza de vida y el envejecimiento de la población pronostican un incremento en su prevalencia en los próximos años, por lo que representa un problema sanitario, social y económico de primer orden que debería ser prioritario para la investigación biomédica.

Esta patología es un trastorno que afecta a la función de un área del encéfalo como consecuencia de la interrupción brusca en la circulación cerebral. Atendiendo a la patología subyacente, los ictus pueden tener un origen hemorrágico, debido a la ruptura de un vaso sanguíneo, aunque en su gran mayoría son de tipo isquémico, producidos por una obstrucción en la vasculatura que reduce el aporte sanguíneo adecuado a una región del cerebro. En cualquier caso, la alteración del flujo sanguíneo cerebral puede ser transitoria o permanente, si no se resuelve espontánea o terapéuticamente. En la actualidad, el único tratamiento aprobado para la isquemia cerebral es la trombolisis con el activador tisular del plasminógeno (tPA), que ayuda a disolver rápidamente el coágulo que obstruye la arteria (del Zoppo et al., 1992). Sin embargo, la ventana terapéutica del tPA está limitada a 3-4.5 horas tras el inicio de los síntomas y su uso está asociado a una serie de contraindicaciones fundamentalmente relacionadas con complicaciones hemorrágicas (Group, 1997), lo que restringe la administración trombolítica a un número muy reducido de pacientes (<10%). Para facilitar el tratamiento temprano y reducir el daño cerebral y la discapacidad de los pacientes, es esencial un diagnóstico rápido que pueda discriminar entre los diferentes tipos de ictus o diferenciarlos de otras patologías con síntomas similares. No obstante, el diagnóstico actual consiste en un examen clínico, cuyos resultados pueden ser poco precisos, complementado con técnicas de imagen cerebral, que también presentan inconvenientes como su disponibilidad limitada, su alto coste y el tiempo necesario para la interpretación de los resultados (Grotta et al., 1999). Los biomarcadores sanguíneos como método de evaluación complementario del ictus han despertado un creciente interés pero, pese a una variedad de candidatos potenciales, ninguno ha demostrado la sensibilidad y especificidad necesarias para su uso médico (Foerch et al., 2009). De igual modo, la alta prevalencia de la isquemia cerebral requiere con urgencia el desarrollo de herramientas alternativas para su tratamiento. A pesar de la intensa investigación en este área, las aproximaciones terapéuticas que han demostrado capacidad neuroprotectora en estudios con modelos animales han fracasado en su translación a la práctica clínica. Por tanto, todavía es necesaria una mejor caracterización de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la muerte neuronal subsiguiente al ictus, que posibiliten un mejor enfoque para el diseño de nuevos abordajes terapéuticos y la detección de biomarcadores específicos asociados con el curso de esta enfermedad.

2. Núcleo y penumbra isquémicos

Tras unos pocos minutos de isquemia cerebral, las regiones del parénquima más afectadas por la reducción del riego sanguíneo y, con ello, mayor grado de privación de oxígeno y glucosa, experimentan un daño irreversible que no es recuperable incluso si el flujo es restablecido (Dirnagl et al., 1999, Moustafa and Baron, 2008). Esta zona se conoce como núcleo del infarto (**Fig. I1**) y se caracteriza por una muerte neuronal rápida de tipo necrótica, debida a un fallo bioenergético total y la pérdida de la homeostasis iónica, procesos de lipólisis y proteólisis, así como fragmentación de las membranas celulares (Martin et al., 1994). Este núcleo necrótico está rodeado por un área de tejido cerebral que sufre una disminución moderada de la irrigación sanguínea, conocida como penumbra isquémica, y que se caracteriza por ser funcionalmente silente pero metabólicamente activa (Astrup et al., 1981). En las etapas iniciales de la isquemia cerebral, esta área periférica constituye una importante fracción del

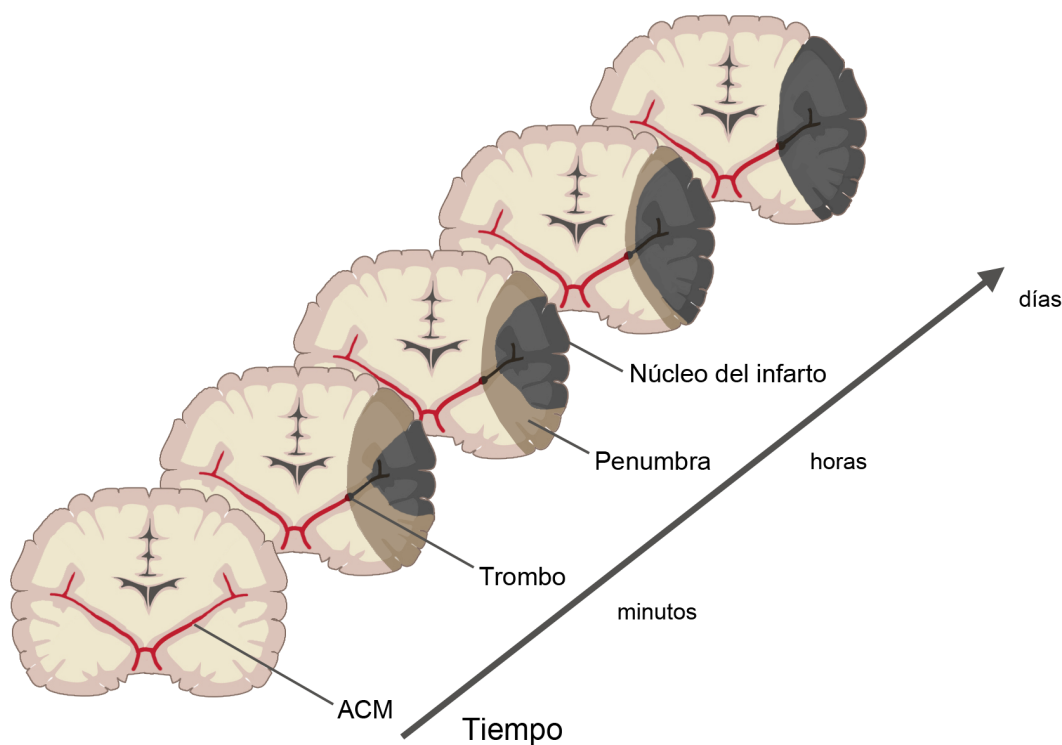


Figura I1. Evolución del infarto en isquemia cerebral. La reducción del flujo sanguíneo por oclusión, por ejemplo, de la arteria cerebral media (ACM) por un trombo produce un daño severo en una región del tejido, conocida como núcleo del infarto. El área circundante, con un aporte sanguíneo residual, es la penumbra isquémica, que se caracteriza por ser funcionalmente silente pero metabólicamente intacta y, por ello, potencialmente recuperable. Ambas estructuras son dinámicas a lo largo del tiempo y el espacio, de modo que, si no existe una recuperación espontánea o terapéutica, el núcleo del infarto va expandiéndose a costa de la zona de penumbra. Adaptado de (Dirnagl et al., 1999).

volumen total de la lesión, hasta el 50% (Ginsberg, 2003). Sin embargo, si no se recupera el riego sanguíneo, el núcleo del infarto se expande gradualmente hacia la penumbra y esta zona potencialmente recuperable acaba desapareciendo (Markus et al., 2003). La progresión del núcleo isquémico se debe a procesos neurotóxicos de degeneración neuronal secundaria tales como la excitotoxicidad, la inflamación o la apoptosis (Ferrer and Planas, 2003). Por tanto, la penumbra isquémica representa una oportunidad para prevenir o atenuar la propagación de la enfermedad bloqueando los mecanismos de muerte neuronal retardada (Ginsberg, 2003).

3. Mecanismos patogénicos de la isquemia cerebral

Los déficits de oxígeno y glucosa que ocurren tras la oclusión vascular son el origen de los mecanismos que llevan a la muerte neuronal y el consecuente daño cerebral. El tejido nervioso depende casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa para la producción de energía, por lo que la falta de oxígeno y glucosa reduce drásticamente la producción de ATP (Martin et al., 1994). La reducción energética inhibe el funcionamiento de la Na^+/K^+ -ATPasa, causando una profunda pérdida de los gradientes iónicos y la despolarización de neuronas y astrocitos (Hansen and Nedergaard, 1988). El resultado es la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VDCCs) que conlleva la exocitosis de aminoácidos excitatorios al medio extracelular, particularmente glutamato (Rothman and Olney, 1986). Simultáneamente, se produce una alteración del funcionamiento de los transportadores de glutamato que comienzan a operar en reverso, reduciéndose la recaptación de los neurotransmisores y promoviendo su liberación y acumulación en el espacio extracelular (Rossi et al., 2000). El exceso de glutamato en

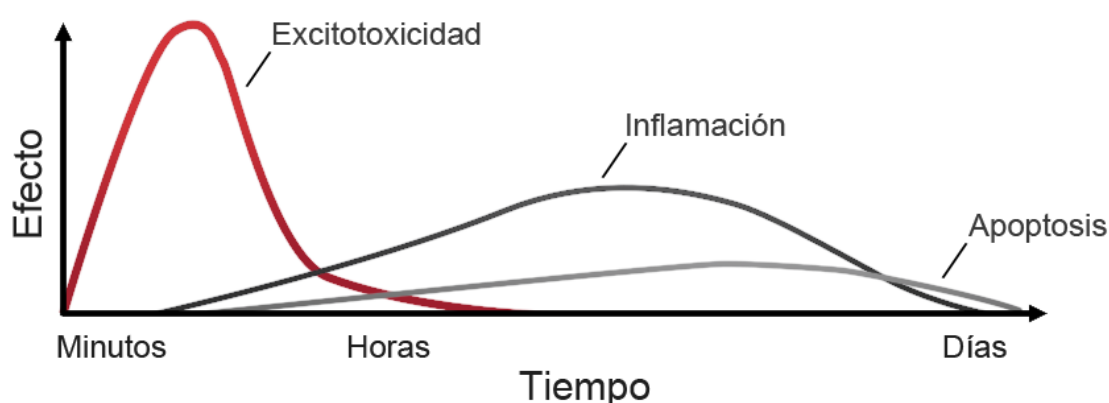


Figura I2. Cinética de los mecanismos patogénicos de la isquemia cerebral. La oclusión de un vaso sanguíneo por un trombo desencadena varios mecanismos que conllevan a la muerte celular en la región cerebral afectada. Cada uno de estos procesos ocurre en un momento determinado tras el inicio de la lesión (eje de abscisas) y su acción tiene un impacto diferente sobre el daño final producido (eje de ordenadas). Adaptado de (Dirnagl et al., 1999).

las sinapsis produce una activación patológica o sobreactivación de sus receptores metabotrópicos e ionotrópicos, fundamentalmente los de tipo N-metil-D-aspartato (NMDARs), lo que desencadena un tipo de insulto neuronal denominado excitotoxicidad (Rothman and Olney, 1986) (**Fig. I2**). Este mecanismo de muerte neuronal secundaria, que se induce de manera temprana, consta de una gran cantidad de eventos deletéreos, entre los que se incluyen el incremento del calcio intracelular, la generación de radicales libres o la disfunción mitocondrial.

La isquemia cerebral se acompaña de una reacción inflamatoria en la zona afectada, que puede continuar por días o semanas tras la lesión. Estos procesos inflamatorios también contribuyen a la progresión del daño cerebral y exacerban los déficits neurológicos. Los procesos neurotóxicos desencadenados al inicio del ictus isquémico inducen la expresión de genes pro-inflamatorios como el factor nuclear κ B (NF κ B), la liberación de citoquinas y quimioquinas, y la expresión y activación de metaloproteinasas de la matriz (MMP) (Schwaninger et al., 2006, Dirnagl et al., 2009). Estas endopeptidasas dependientes de zinc degradan componentes de la lámina basal y la matriz extracelular, debilitando los vasos sanguíneos y alterando la permeabilidad de la BHE (revisado en Morancho et al., 2010). De esta manera, se permite la infiltración de leucocitos al cerebro, con un retraso de 4-6 horas tras el inicio de la enfermedad, y la activación microglial y astrogial (**Fig. I2**) (Yrjanheikki et al., 1999). La inflamación post-isquémica participa en el daño cerebral a través de la acción neurotóxica del óxido nítrico (NO) y la ciclooxigenasa-2 entre otros mecanismos patológicos (Dirnagl et al., 1999).

Finalmente, las células cerebrales que están comprometidas por un exceso de la activación glutamatérgica, la elevada concentración de calcio y radicales libres, o el daño mitocondrial y del ADN pueden morir por procesos de necrosis o apoptosis. De manera general, la necrosis es el mecanismo predominante en la región del núcleo isquémico mientras que en la penumbra tiene lugar fundamentalmente procesos apoptóticos, que se inician horas después del comienzo del ictus cerebral y pueden prolongarse por varios días (Leist and Nicotera, 1998).

4. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad está considerada como el mecanismo central de la muerte neuronal secundaria en isquemia cerebral (Olney, 1986). El término excitotoxicidad, definido por Olney (1969) se refiere a los efectos tóxicos que desencadena una excesiva cantidad de glutamato al sobreactivar los receptores excitatorios (Choi et al., 1987). Como consecuencia, se produce una entrada masiva de Ca^{2+} que, a su vez, causa la alteración de la maquinaria implicada en la homeostasis celular de este ión (**Fig. I3**), como son el intercambiador sodio-calcio (NCX) y sus reservorios intracelulares, mitocondria y retículo endoplásmico, lo que induce un incremento aún mayor del calcio citosólico y exagera sus efectos deletéreos (Bano et al., 2005). Además, estas condiciones excitotóxicas también permiten una entrada de Na^+ y Cl^- a través de canales para iones monova-

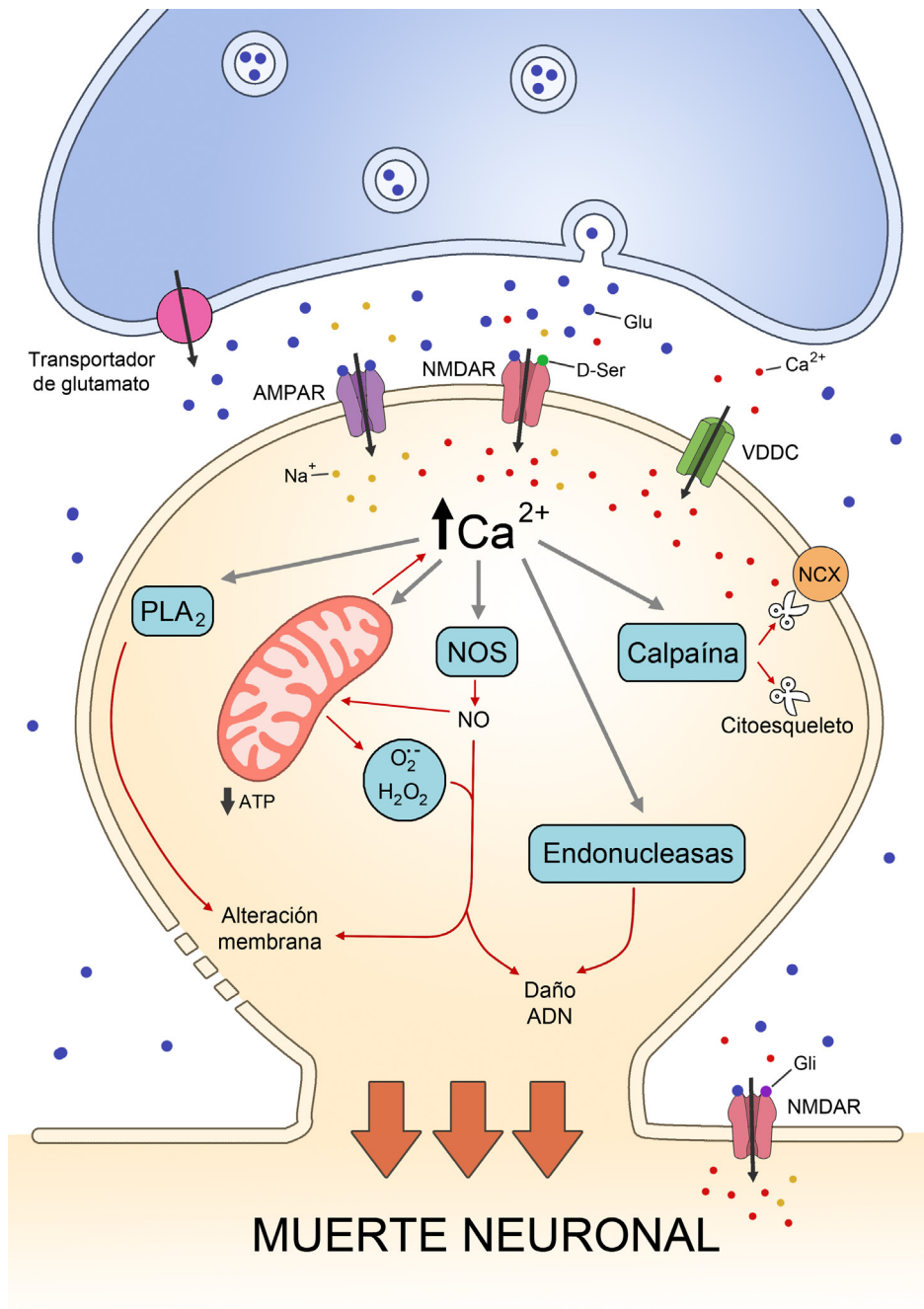


Figura I3. Principales mecanismos en excitotoxicidad. El fallo energético producido como consecuencia de la falta de oxígeno y nutrientes, provoca en último término la exocitosis masiva de neurotransmisores y la alteración de los transportadores de glutamato, que comienzan a funcionar en reverso. El exceso de glutamato en el espacio extracelular induce la sobreactivación de sus receptores, en especial los NMDARs sinápticos y extrasinápticos, que produce una entrada masiva de Ca^{2+} al interior celular. Además, la concentración de este ión se ve incrementada por la disfunción de reservorios intracelulares como la mitocondria y el retículo endoplásmico, la activación de VDCCs y la inactivación del intercambiador sodio-calcio NCX3. El exceso de Ca^{2+} desencadena diversos mecanismos deletéreos entre los que se incluyen la activación de proteasas, fosfolipasas, endonucleasas y enzimas implicadas en la liberación de NO, que actúan sinérgicamente conduciendo a la neurona a la muerte celular.

lentes como, por ejemplo, el receptor de glutamato de tipo AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato), que es seguida por el flujo pasivo de agua, causando edema intracelular. La excesiva concentración de calcio en el interior de la célula puede desencadenar muchas cascadas neurotóxicas, incluyendo la hiperactivación de enzimas proteolíticas como MMPs (Jourquin et al., 2003), caspasas (Tenneti and Lipton, 2000) y, sobre todo, calpaína, que degradan múltiples proteínas esenciales para el funcionamiento celular (Siman and Noszek, 1988, Hong et al., 1994). De igual manera, la activación de enzimas como la fosfolipasa A₂ (PLA₂), la ciclooxygenasa, la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la xantina oxidasa, junto con la disfunción mitocondrial, producen una alta cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que provocan múltiples daños en el ADN, las proteínas celulares y las membranas lipídicas (Mehta et al., 2013). Todos estos complejos mecanismos excitotóxicos actúan sinérgicamente causando un deterioro de la señalización y arquitectura celulares, que concluye en la activación de necrosis o apoptosis dependiendo de la severidad de la lesión y la relativa velocidad del proceso.

Hay que resaltar que la excitotoxicidad también es fundamental en muchas otras patologías del sistema nervioso central (SNC) como el trauma agudo, la hipoglucemia y la epilepsia (Choi, 1988, Choi and Rothman, 1990, Meldrum, 1993), y diversas enfermedades neurodegenerativas de carácter crónico, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, corea de Huntington, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica (Beal, 1998, Tabrizi et al., 1999, Pitt et al., 2000, Hynd et al., 2004, Koutsilieri and Riederer, 2007, Gonsette, 2008). Por lo tanto, el estudio de los mecanismos moleculares que se desencadenan durante el proceso de excitotoxicidad y el desarrollo de herramientas de neuroprotección basadas en éstos adquiere una importancia fundamental no sólo en isquemia cerebral sino también en el resto de enfermedades del sistema nervioso asociadas con esta forma de muerte neuronal.

5. Papel dual de los NMDARs en supervivencia y muerte neuronal

Todos los miembros de la familia de receptores de glutamato están involucrados en la excitotoxicidad (Choi, 1987) aunque destacan, por su papel clave en este proceso, los NMDARs (Hartley et al., 1993). Éstos son canales iónicos altamente permeables para el calcio cuya activación requiere la unión de sus coagonistas (glutamato, o su análogo farmacológico NMDA, y glicina o D-serina) y la depolarización simultánea de la membrana neuronal (Hollmann & Heinemann, 1994). Por ello, muchas aproximaciones terapéuticas se han basado en el uso de antagonistas de esta subfamilia de receptores. A pesar de la obtención de resultados prometedores con los antagonistas de los NMDARs en modelos animales de isquemia, ninguno de los numerosos compuestos diseñados han sido aprobados para su uso clínico. Esto se debe a la pequeña ventana terapéutica para su administración y sus abundantes efectos secundarios, fundamentalmente consecuencia del papel dual que ejercen estos receptores tanto en los procesos de muerte como en los de supervivencia

y plasticidad neuronal (Hardingham and Bading, 2003), como veremos a continuación. No obstante, recientes avances en la comprensión de los mecanismos de acción de los NMDARs están permitiendo producir una nueva generación de compuestos capaces de actuar específicamente sobre las acciones patológicas del receptor sin silenciar su papel clave en la fisiología celular.

Teniendo en cuenta la localización específica de muchas proteínas sinápticas y extrasinápticas, es posible que los NMDARs estén acoplados funcionalmente a diferentes vías de señalización dependiendo de su ubicación subcelular. Según esta hipótesis, los NMDARs sinápticos promueven la supervivencia neuronal, mientras que los extrasinápticos, que se activarían cuando hay un exceso de glutamato en el cerebro como durante la isquemia cerebral, impulsan la muerte celular (Hardingham et al., 2002). A este respecto, varios grupos han conseguido demostrar funciones diferentes y, en ocasiones, opuestas según la posición de los NMDARs en las neuronas (Lu et al., 2001, Hardingham et al., 2002, Ivanov et al., 2006). En concreto, la estimulación de los NMDARs sinápticos favorece la neuroprotección a través de la actividad de ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*), la fosforilación de CREB (*cAMP response element-binding protein*) y la expresión de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), mientras que la activación conjunta con los NMDARs extrasinápticos promueve mecanismos que bloquean de manera generalizada y dominante estas vías de supervivencia neuronal (Chandler et al., 2001, Leveille et al., 2008, Hardingham and Bading, 2010). La diferente respuesta nuclear parece posible gracias a una proteína intermediaria denominada *Jacob* que permite discernir entre la activación de los NMDARs sinápticos o extrasinápticos. En ambos casos se induce la traslocación nuclear de esta proteína, pero sólo los receptores sinápticos son capaces de fosforilar *Jacob* a través de un mecanismo ERK1/2-dependiente, lo que se asocia con niveles más elevados de CREB fosforilado (pCREB), BDNF y Arc3.1 (Karpova et al., 2013). Otra prueba adicional de las acciones contrapuestas de los NMDARs en las neuronas es la potenciación de las defensas antioxidantes, promovida por la activación fisiológica de los NMDARs, mecanismo que resulta comprometido cuando los receptores extrasinápticos son estimulados (Papadia et al., 2008). Además, los dos tipos de NMDARs también parecen diferir en sus coagonistas endógenos, utilizando D-serina los receptores sinápticos y glicina los extrasinápticos (**Fig. I3**), así como en su papel sobre la plasticidad sináptica, estando los receptores localizados en la sinapsis involucrados en la potenciación a largo plazo (LTP), mientras que ambos serían necesarios para la depresión a largo plazo (LTD) (Papouin et al., 2012). Sin embargo, las diferencias no están tan claramente delimitadas y existen importantes evidencias en contra de esta hipótesis que implican a los NMDARs sinápticos no sólo en las vías de supervivencia, sino también en la inducción de la muerte neuronal (Papouin et al., 2012, Wroge et al., 2012, Zhou et al., 2013).

La dualidad de estos receptores también se deja translucir en su composición. Los NMDARs se asocian a modo de heterotetrámeros, formados por dos subunidades obligatorias GluN1 en combinación con dos subunidades adicionales de tipo GluN2 (GluN2A–GluN2D) y/o GluN3 (GluN3A–GluN3B). Ello da lugar a una población heterogénea de NMDARs con diversas

propiedades farmacológicas, cinéticas y vías de señalización acopladas (Cull-Candy et al., 2001, Sanz-Clemente et al., 2013). La gran mayoría de los NMDARs en el SNC son complejos GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B o GluN1/GluN2A/GluN2B, y las distintas subunidades GluN2 se caracterizan por tener una expresión temporal y regional muy diferente. En las etapas embrionarias, dominan los receptores que contienen GluN2B, ya que la expresión de GluN2A no comienza hasta el nacimiento. En el adulto, por lo general, los receptores con las subunidades GluN2A tienen una localización sináptica mientras que los GluN2B son extrasinápticos, aunque esta distribución no es absoluta (Tovar and Westbrook, 1999, Martel et al., 2009b). Estas observaciones se ven reforzadas por la relación de los NMDARs de tipo GluN2A con la supervivencia neuronal y la conexión entre la muerte celular y los receptores de tipo GluN2B (Lai et al., 2011). Existen evidencias convincentes que indican que las regiones C-terminales intracelulares de las subunidades GluN2 son responsables de las características anteriores, ya que la sustitución de la secuencia citoplasmática de GluN2B por la de GluN2A previene la muerte excitotóxica (Martel et al., 2012). Por tanto, las proteínas implicadas en la señalización excitotóxica deben estar asociadas, o interactuar directamente, con la región citoplasmática de GluN2B, lo que explicaría que la entrada masiva de Ca^{2+} a través de los NMDARs resulte más neurotóxica que un flujo equivalente de calcio por medio de otros canales, como los VDCCs (Tymianski et al., 1993).

6. Nuevas estrategias de neuroprotección basadas en los mecanismos excitotóxicos

A la vista del papel primordial en la muerte excitotóxica de los NMDARs extrasinápticos que poseen subunidades GluN2B y utilizan glicina como coagonista, se han desarrollado inhibidores cada vez más específicos que no bloquean sus funciones fisiológicas y, por tanto, exhiben menores efectos secundarios. Sin embargo, cualquier compuesto antagonista de los NMDARs no sería efectivo una vez producida su sobreactivación y la de sus vías de señalización asociadas a muerte, por lo que su eficacia estaría restringida a una ventana terapéutica muy corta. Con el fin de sortear estas limitaciones, en lugar de centrarse en los receptores, las investigaciones actuales están enfocadas al desarrollo de herramientas que puedan interferir la señalización asociada a la muerte excitotóxica, especialmente aquella que tiene lugar después del inicio de la isquemia cerebral, de modo que el tratamiento pueda ser eficaz en la práctica clínica incluso cuando se administre con retraso.

Uno de los principales inconvenientes para la acción cerebral de los compuestos terapéuticos es la oposición que presenta la BHE a su transporte. A fin de sortear este problema, los CPPs (*cell-penetrating peptides*) se han erigido recientemente como una herramienta eficaz y segura para su uso clínico en el tratamiento de patologías del SNC. Los CPPs engloban a un conjunto de péptidos de distinta naturaleza química, aunque frecuentemente con carga positiva y menos de 30 aminoácidos, capaces de atravesar la BHE y las membranas celulares sin producir efectos citotóxicos, facilitando la entrada al interior de la célula de moléculas de diferente naturaleza como

otros péptidos, ácidos nucleicos o incluso proteínas (Deshayes et al., 2005). Además, la entrada de estos péptidos está favorecida en las condiciones de excitotoxicidad (Vaslin et al., 2011), una propiedad especialmente atractiva para el tratamiento de patologías como la isquemia cerebral. En los últimos años, se han utilizado muchos CPPs derivados de proteína transactivadora Tat del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), formados por una corta secuencia básica responsable de las propiedades transductoras de esta proteína. El uso de estos péptidos Tat junto con el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, basadas en el avance del conocimiento sobre los mecanismos de excitotoxicidad, ha dado lugar a prometedoras estrategias de neuroprotección que actualmente se encuentran en distintas fases de desarrollo experimental y clínico.

6.1 Efectores de la señalización excitotóxica que interaccionan con los NMDARs

Uno de los mecanismos excitotóxicos más caracterizados es la formación del complejo GluN2B-PSD95-nNOS (**Fig. I4**). A través de la unión con PSD95 (*postsynaptic density-95 protein*), importante proteína de andamiaje de la PSD que cuenta con múltiples dominios de interacción proteica, nNOS puede situarse en estrecha proximidad al poro del canal del receptor de glutamato y activarse eficientemente por el calcio que fluye a través del NMDAR (Christopherson et al., 1999, Sattler et al., 1999). En condiciones de excitotoxicidad, se genera óxido nítrico (NO) en exceso que puede reaccionar con el anión superóxido dando lugar a peroxinitrito. Este último es responsable de la peroxidación lipídica, daño al ADN y apertura del canal catiónico TRPM7, que incrementa aún más los niveles de calcio intracelular (Lipton et al., 1993, Aarts et al., 2003). El NO también promueve la S-nitrosilación de ciertas proteínas como MMP-9, que se activa y fomenta la vía proteolítica extracelular contribuyendo a la muerte neuronal (Gu et al., 2002, Manabe et al., 2005). La inhibición de la actividad de nNOS se ha demostrado que es una importante diana terapéutica, ya que previene la excitotoxicidad mediada por NMDA en cultivos de neuronas (Dawson et al., 1991) y atenúa el infarto en animales sometidos a isquemia cerebral (Huang et al., 1994). Sin embargo, nNOS también cumple importantes funciones en el cerebro por lo que, cara a su translación a la práctica clínica, sería necesario bloquear de manera selectiva sus acciones relacionadas con la muerte neuronal y así evitar posibles efectos secundarios. Para ello, el grupo de Michael Tymianski desarrolló un péptido que interfiere la interacción NMDAR-PSD95, puesto que corresponde a los 9 aminoácidos del extremo C-terminal de GluN2B (NR2B9c) e incluye el ligando de unión de esta subunidad para dominios PDZ (*Post-synaptic density-95/Disc large/Zonula occludens ligand*, PDZ-L), tales como los existentes en PSD95 (Kornau et al., 1995). La fusión de este péptido con el dominio de transducción de Tat (Tat-NR2B9c o NA-1) ha demostrado capacidad neuroprotectora frente a la excitotoxicidad inducida por sobreactivación del NMDAR (Aarts et al., 2002), sin afectar su corriente (Sattler et al., 1999) ni sus funciones en plasticidad sináptica y supervivencia neuronal (Soriano et al., 2008, Martel et al., 2009a). Asimismo, el péptido NA-1 es capaz de reducir el infarto

cerebral producido en modelos animales murinos (Aarts et al., 2002, Soriano et al., 2008, Sun et al., 2008, Bratane et al., 2011) y en primates que presentan una corteza cerebral con circunvoluciones, semejante a la de humanos (Cook et al., 2012b, a). De manera más importante, en un ensayo clínico de fase 2 con pacientes en los que se realizó reparación endovascular de un aneurisma intracraneal, se ha demostrado que NA-1 es capaz de reducir el número de infartos isquémicos iatrogénicos, muy frecuentes tras este tipo de intervenciones (Hill et al., 2012). Estos hallazgos ponen de manifiesto que la neuroprotección es asequible en humanos y resaltan que las estrategias dirigidas contra la señalización excitotóxica son factibles en la práctica clínica.

La quinasa DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) también está asociada con ciertas formas de muerte celular apoptótica (revisado en Nair et al., 2013). En respuesta a isquemia cerebral, se activa fuertemente por un mecanismo mediado por la fosfatasa calcineurina y es reclutada a la región citoplasmática de GluN2B, donde potencia la acción del receptor fomentando la excitotoxicidad (Tu et al., 2010). Además, la activación de esta proteína pue-

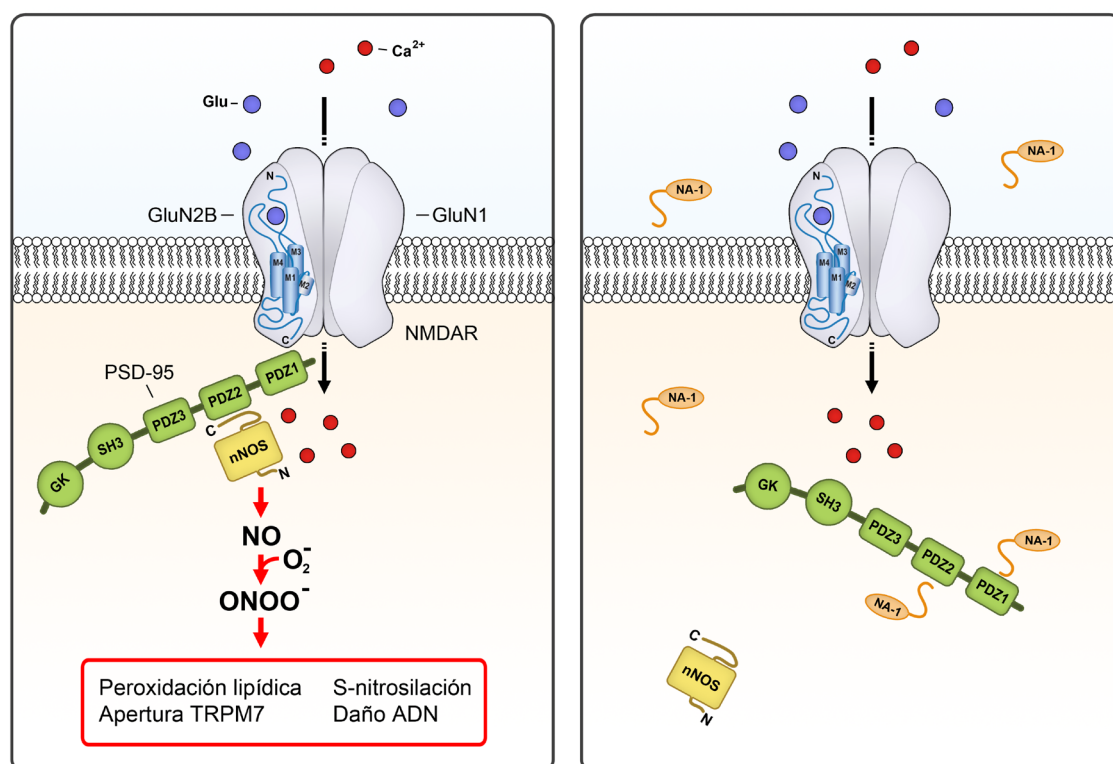


Figura I4. Mecanismo de acción de NA-1 en excitotoxicidad. Izquierda: PSD95 se asocia a través de su dominio PDZ1 con el PDZ-L de la región C-terminal de la subunidad GluN2B de los NMDARs (-ESDV), y se une mediante su PDZ2 con nNOS, lo que permite la aproximación de esta enzima al poro del canal. En excitotoxicidad, la entrada masiva de Ca^{2+} induce la sobreactivación de nNOS y la producción en exceso de NO que puede reaccionar con el anión superóxido (O_2^-) originando peroxinitrito (ONOO^-). Estas especies reactivas contribuyen a la muerte neuronal excitotóxica. Derecha: el tratamiento con un péptido Tat que contiene la secuencia C-terminal de GluN2B (NA-1) desacopla el complejo GluN2B-PSD95-nNOS, reduciendo la producción de NO y mejorando la viabilidad de las neuronas sometidas a un ambiente excitotóxico. Adaptado de (Tymianski, 2011).

de realizarse por un mecanismo independiente ejercido por ERK1/2, que produce además la retención de estas quinasas en el citoplasma y previene su señalización nuclear pro-supervivencia (Chen et al., 2005). El bloqueo de la interacción GluN2B-DAPK1 con un péptido Tat que contiene la secuencia del receptor donde se produce la unión, previene la amplificación en la corriente del NMDAR inducida por DAPK1 y es eficaz en la protección frente a la muerte neuronal en un modelo murino de isquemia cerebral (Tu et al., 2010).

Otra de las proteínas implicadas en la muerte neuronal excitotóxica que interacciona directamente con los NMDARs es PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*). Esta fosfatasa se une específicamente al dominio citoplasmático de las subunidades GluN1 de receptores que contienen GluN2B, pero no de aquéllos que están compuestos por GluN2A, activando su expresión en membrana y potenciando su función (Ning et al., 2004). Este mecanismo, junto con su función antagonista de la vía de señalización de supervivencia PI3K/Akt (*Phosphatidylinositol 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*), exacerbaba la muerte neuronal en un modelo de isquemia. Recientemente se ha demostrado que la estimulación excitotóxica de los NMDARs induce la translocación nuclear de PTEN, un paso esencial en la muerte neuronal NMDA-dependiente tanto *in vitro* como *in vivo* (Zhang et al., 2013), revelando a esta fosfatasa como una diana terapéutica en isquemia. De hecho, se ha demostrado que la inhibición de la translocación nuclear de PTEN tiene un efecto neuroprotector frente al daño neuronal en rata, incluso 6 horas post-ictus. Para ello, se ha utilizado un péptido Tat que contiene el residuo de lisina cuya mono-ubiquitinación es requerida para el transporte nuclear de PTEN, así como sus secuencias circundantes (Zhang et al., 2013).

6.2 Efectores de la señalización excitotóxica que modulan la expresión génica

La muerte neuronal en isquemia es un proceso progresivo y entre sus mecanismos tardíos se encuentra la regulación transcripcional, que tiene gran importancia en el desarrollo de la patología. En neuronas de hipocampo existen dos programas transcripcionales que prácticamente no solapan y conducen a la supervivencia o muerte neuronales en función, respectivamente, de la localización sináptica o extrasináptica de los NMDARs activados (Zhang et al., 2007, Zhang et al., 2009). La señalización excitotóxica requiere la expresión de genes implicados en la neurotoxicidad, al tiempo que reprime genes que promueven la supervivencia neuronal. Por ejemplo, se ha descrito la inhibición transcripcional en condiciones de excitotoxicidad de la subunidad GluN1 del NMDAR (Gascon et al., 2005) y de la proteína Kidins220 (kinase D-interacting substrate of 220 kDa) (Lopez-Menendez et al., 2009), ambas esenciales en la función y supervivencia neuronales. Por lo tanto, los factores de transcripción responsables de estos cambios en la expresión son un posible objetivo en la búsqueda de nuevas estrategias de neuroprotección, ya que ofrecen una ventana terapéutica más amplia. Un ejemplo es la

proteína SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein-1*), principal factor de transcripción de genes relacionados con el metabolismo lipídico, que resulta activado y translocado al núcleo tras la sobreactivación de los NMDARs y tiene un papel importante en la muerte neuronal (Taghibiglou et al., 2009). El bloqueo mediante un péptido Tat de la degradación de Insig-1 (*insulin-induced gene-1*), proteína encargada de la inhibición de SREBP1, previene la activación del factor de transcripción, y reduce significativamente el daño neuronal inducido por isquemia cerebral y los déficits comportamentales en los animales afectados (Taghibiglou et al., 2009).

La quinasa JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) es un efector principal en la señalización que conlleva la muerte neuronal en excitotoxicidad, y permanece fuertemente activada hasta 24 horas después del inicio del infarto cerebral (Borsello et al., 2003). Utilizando como anteriormente un péptido Tat, seguido por secuencias que reproducen el dominio de unión a JNK de su inhibidor JIP (*JNK-interacting protein*), se inhibe la actividad de esta quinasa y la fosforilación de sus sustratos c-Jun y Elk-1. De manera consistente con la duradera actividad de JNK tras un ictus, este péptido tiene efecto neuroprotector en modelos animales de isquemia cerebral transitoria cuando se administra hasta 12 horas después de la oclusión en individuos jóvenes, o tras 6 horas en adultos (Borsello et al., 2003). La neuroprotección ejercida por este péptido correlaciona con la prevención de un aumento en la activación de c-Jun y en la transcripción mediada por c-Fos.

6.3 Sustratos de calpaína cuyo procesamiento contribuye a la excitotoxicidad

Uno de los eventos clave en excitotoxicidad es la activación masiva de calpaína, una cisteín-proteasa dependiente de Ca^{2+} que contribuye de forma activa a la neurodegeneración mediante el procesamiento de múltiples sustratos (Siman and Noszek, 1988, Hong et al., 1994, Bevers and Neumar, 2008), algunos de ellos con papeles cruciales en vías de supervivencia neuronal (Vosler et al., 2008). En el cerebro, se expresan al menos dos isoformas de esta proteasa que difieren según su sensibilidad y activación por calcio (Mellgren, 1980): la ubicua m-calpaína que, en ensayos *in vitro*, precisa unos niveles de Ca^{2+} en el rango de 400–800 μM , y μ -calpaína que posee unos requerimientos menores, de 3–50 μM (Goll et al., 2003). A pesar de que se ha descrito que μ -calpaína es la principal responsable de los efectos adversos mediados por esta proteasa en excitotoxicidad e isquemia cerebral (Bevers et al., 2009, Bevers et al., 2010), otras isoformas parecen intervenir en función de la severidad del daño producido. El intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX3 es uno de los sustratos de calpaína que la relacionan directamente con la intensificación del proceso de excitotoxicidad. Este intercambiador es responsable de restablecer la homeostasis del calcio intracelular tras el daño excitotóxico y su proteólisis hace irreversible el incremento de calcio en el interior celular (Bano et al., 2005). En estas condiciones, la calpaína también es responsable del procesamiento del extremo C-terminal de las subunidades GluN2A y GluN2B del NMDAR (Gascon et al., 2008), dando lugar a receptores

truncados incapaces de asociarse con las proteínas adaptadoras y señalizadoras necesarias para su función normal (Husi et al., 2000). La inhibición de calpaína, por tanto, ofrece una interesante diana de neuroprotección y su ventana terapéutica es bastante más amplia que el bloqueo directo de la actividad de los NMDARs (Brorson et al., 1995). No obstante, esta proteasa es requerida para el funcionamiento normal de la célula y ejerce papeles críticos en procesos como la motilidad celular y la plasticidad sináptica. Por tanto, el reto consiste en inhibir las consecuencias patológicas de la sobreactivación de la calpaína pero preservando los aspectos fisiológicos de su función. En este sentido, el desarrollo de inhibidores que impidan su acción sobre determinados sustratos, cuyo procesamiento contribuye a la muerte neuronal excitotóxica, ofrece un perfil potencialmente más seguro con vistas a su uso en la práctica clínica.

La proteína STEP (*striatal-enriched protein tyrosin phosphatase*) es sustrato de calpaína y se ha establecido como una posible diana terapéutica. La isoforma STEP₆₁, presente en los terminales postsinápticos, tiene como sustratos dos proteínas con funciones opuestas, p38 implicada en muerte neuronal y ERK1/2 relacionada con la supervivencia. La activación específica de los NMDARs sinápticos promueve la ubiquitinación y degradación de la fosfatasa, prolongando la acción de ERK, mientras que la estimulación excitotóxica de los NMDARs extrasinápticos induce el corte de STEP₆₁ por calpaína en un dominio necesario para la unión de sus sustratos, favoreciendo la función de p38 (Xu et al., 2009). La interferencia del procesamiento de STEP con un péptido Tat cuya secuencia contiene el sitio de corte por calpaína de esta fosfatasa protege frente al daño excitotóxico y la muerte neuronal isquémica (Xu et al., 2009). Siguiendo una estrategia similar, la interrupción con péptidos específicos del procesamiento por calpaína de proteínas con funciones prosupervivencia, como el receptor metabotrópico de glutamato 1 (mGluR1) (Xu et al., 2007) o la proteína TRPC6 (*canonical transient receptor potential channel 6*) (Du et al., 2010) también previene la muerte neuronal excitotóxica tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto demuestra la importancia como estrategia neuroprotectora del mantenimiento de las vías de supervivencia que son truncadas por la acción patológica de la calpaína. En este sentido, resaltan como posibles dianas de neuroprotección otros sustratos de esta proteasa como PKA (Liang et al., 2007), CaMKII (Hajimohammadreza et al., 1997), y CaMKIV (Tremper-Wells and Vallano, 2005). Estas quinasas fosforilan CREB, el principal factor de transcripción implicado en la regulación de genes que son requeridos para la supervivencia neuronal, y el procesamiento de estas enzimas por calpaína podría explicar parcialmente la inactivación de CREB inducida tras la estimulación patológica de los NMDARs (Hardingham et al., 2002).

Otra diana terapéutica atractiva es el receptor de neurotrofinas TrkB (*Tropomyosin-related kinase B*) cuyas vías de señalización resultan profundamente alteradas en condiciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral (Vidaurre et al., 2012). Dada la enorme importancia que tiene este receptor para la viabilidad neuronal, y teniendo en cuenta el éxito de las estrategias previamente descritas, en la presente Tesis Doctoral nos hemos propuesto el desa-

rollo y validación de la capacidad neuroprotectora de péptidos capaces de interferir los diferentes mecanismos que alteran la función del receptor TrkB en condiciones excitotóxicas.

7. Neurotrofinas y sus receptores. Clasificación

Las neurotrofinas son una familia de proteínas que se secretan al espacio extracelular y actúan de manera paracrina y/o autocrina (Lu et al., 2005) controlando muchos procesos cruciales en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso de vertebrados, tales como proliferación, migración, diferenciación, supervivencia, apoptosis y plasticidad sináptica (revisado en Lewin and Barde, 1996, Chao, 2003, Reichardt, 2006). En mamíferos, se han identificado cuatro miembros de esta familia que comparten una alta homología génica y estructural: NGF (Nerve growth factor; Levi-Montalcini and Hamburger, 1951, Cohen et al., 1954), BDNF (Barde et al., 1982), NT-3 (Neurotrophin-3; Hohn et al., 1990) y NT-4 (*Neurotrophin-4*, también conocida como NT-4/5) (Neurotrophin-4, también conocida como NT-4/5; Berkemeier et al., 1991). Todas ellas se sintetizan inicialmente a modo de precursores o proneurotrofinas (31-35 kDa), que son proteolizados dando lugar a las formas maduras (12-13 kDa) (Seidah et al., 1996). Además, las propias proneurotrofinas pueden actuar como moléculas señalizadoras activas que ejercen efectos opuestos a los de su equivalente madura (Lee et al., 2001, Teng et al., 2005). Para mediar sus acciones, estos factores neurotróficos se asocian de manera no covalente como homodímeros y pueden unirse a dos clases diferentes de receptores (Barbacid, 1994, Bothwell, 1995), como se resume en la **Fig. I5**:

La primera es la familia de receptores tirosina quinasa Trk, que incluye TrkA, TrkB y TrkC. Estas proteínas integrales de membrana presentan una alta afinidad en su unión con las neurotrofinas. El factor neurotrófico NGF reconoce específicamente TrkA, mientras que BDNF y NT-4 son ligandos de TrkB, y NT-3 es más promiscua y puede unirse a todos los Trks, pero sus principales funciones son mediadas por TrkC (Kaplan et al., 1991a, Kaplan et al., 1991b, Klein et al., 1991, Dechant et al., 1993, Mahadeo et al., 1994). La unión de las neurotrofinas a sus receptores induce la dimerización de éstos y la autofosforilación de sus dominios quinasa citoplasmáticos, lo que conlleva al inicio de sus cascadas de señalización (Jing et al., 1992, Barbacid, 1994). En cuanto a su distribución, TrkA se encuentra restringida a áreas específicas en el sistema nervioso como las neuronas colinérgicas de la región basal del cerebro, el estriado y el tálamo en el SNC, y las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal, simpático y trigeminal en el sistema nervioso periférico (SNP) (Hempstead et al., 1991, Kaplan et al., 1991a, Kaplan et al., 1991b). Por el contrario, la expresión de TrkB y TrkC es similar y ampliamente distribuida por el tejido nervioso (Barbacid, 1995). También hay que destacar que la señalización de los receptores Trk no está confinada al sistema nervioso sino que está siendo cada vez más reconocida en tejidos no neuronales como la vasculatura (Kermani and Hempstead, 2007).

En segundo lugar, se encuentra el receptor de baja afinidad para NGF, también conocido como $p75^{\text{NTR}}$ (*p75 neurotrophin receptor*) por su peso molecular en humanos. Este receptor puede unirse con similar afinidad a todas las neurotrofinas, aunque también puede interactuar con éstas en su forma precursora en colaboración con el co-receptor Sortilina, lo que puede inducir muerte celular y disminución de la función sináptica (Dechant and Barde, 2002, Roux and Barker, 2002, Nykjaer et al., 2005). La proteína $p75^{\text{NTR}}$ es un miembro de la superfamilia

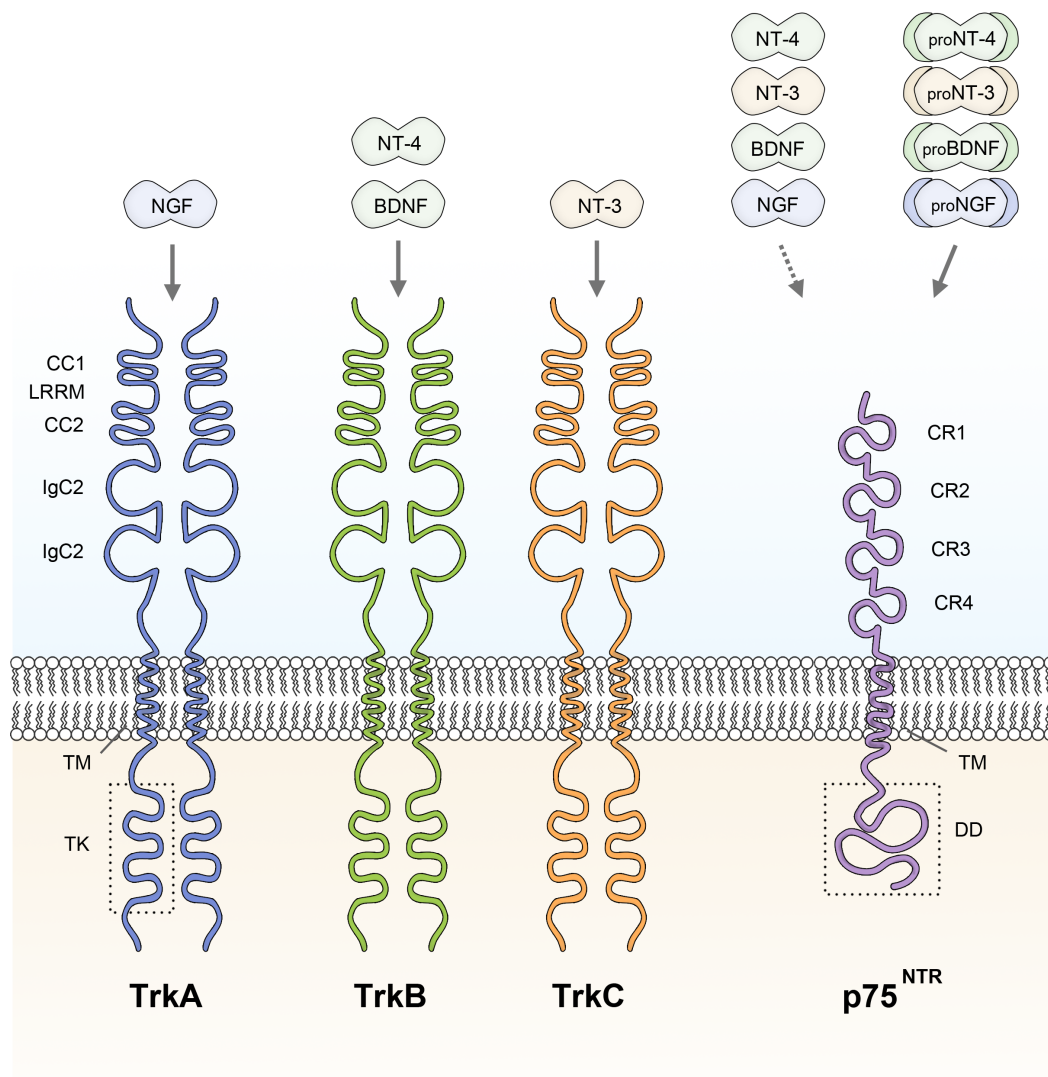


Figura I5. Estructura de los receptores de neurotrofinas y sus ligandos. Los receptores Trk son proteínas unipaso con un dominio tirosina quinasa (TK) en su porción intracelular y una región extracelular estructuralmente constituida por dos dominios ricos en cisteínas (CC1 y CC2), un dominio rico en leucinas (LRRM) y dos dominios de inmunoglobulina de tipo C2 (IgC2). Dentro de este grupo se encuentran TrkA, que se une a NGF, TrkB, que tiene a BDNF y NT-4 como ligandos, y TrkC, que posee mayor afinidad por NT-3. Otro miembro de esta familia es el receptor $p75^{\text{NTR}}$ que puede unirse a todas las neurotrofinas aunque con menor afinidad, así como a sus precursores. Este receptor posee una porción extracelular con cuatro dominios ricos en cisteínas (CR1-4), una región transmembrana (TM) y un dominio de muerte (DD) en la parte intracelular. Adaptada de (Reichardt, 2006).

de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), y presenta una región extracelular compuesta por cuatro dominios ricos en cisteínas (CR1-4), un único dominio transmembrana (TM) y una región citoplasmática que incluye un dominio de muerte (DD) similar al de otros miembros de esta familia (Liepinsh et al., 1997, He and Garcia, 2004). Al carecer de un motivo catalítico, el dominio de muerte media la interacción con otros componentes celulares que transmiten señales importantes para la regulación de la diferenciación y supervivencia neuronal, así como la plasticidad sináptica (Arevalo and Wu, 2006). Algunas de las vías reguladas por $p75^{\text{NTR}}$ en respuesta a neurotrofinas son las reguladas por NF- κ B (Nuclear factor-kappa B, Carter et al., 1996), JNK (Yoon et al., 1998), caspasas (Troy et al., 2002) y Rho GTPasas (Yamashita et al., 1999). Además, $p75^{\text{NTR}}$ puede asociarse con los Trks a modo de co-receptor modulando su afinidad por sus ligandos (Hempstead et al., 1991, Bibel et al., 1999).

8. Estructura de los receptores Trk

Los receptores Trk comparten un alto grado de homología en su secuencia y una organización estructural muy conservada que comprende, desde la región N-terminal a la C-terminal: una región extracelular altamente glicosilada, un único segmento transmembrana y una región intracelular que contiene un dominio tirosina quinasa (TK) (**Fig. I5**). La región extracelular contiene cinco dominios, los tres primeros consisten en repeticiones ricas en leucinas (LRRM) flanqueadas por dos regiones ricas en cisteínas (CC1 y CC2), seguidos de dos dominios globulares de inmunoglobulina de tipo C2 (IgC2) próximos a la región transmembrana (Schneider and Schweiger, 1991). Los receptores Trks interaccionan con sus ligandos a través del motivo IgC2 más próximo a la membrana plasmática, que además es responsable de su especificidad, aunque el resto de dominios pueden modular esta interacción (Holden et al., 1997, Kojima et al., 1999). Los motivos IgC2 también previenen la activación incontrolada de los receptores en ausencia de ligando, probablemente manteniéndolos en forma de monómeros (Arevalo et al., 2000), aunque existen evidencias que indican un estado dimérico e inactivo de los receptores Trk en condiciones basales (Shen and Maruyama, 2011, 2012).

Conjuntamente a los receptores Trk que presentan esta organización, se han identificado diversas isoformas que presentan variaciones respecto a esta estructura general y que son generadas por procesamiento alternativo de los precursores de sus ARNm. Por ejemplo, el locus de TrkA puede codificar cuatro isoformas, TrkA-I y TrkA-II que poseen la composición típica de estos receptores, y dos isoformas que carecen de varias de las repeticiones en el motivo extracelular rico en leucinas (Clary and Reichardt, 1994). De igual manera, se han detectado varias isoformas truncadas de TrkB y TrkC que carecen del dominio quinasa (Middlemas et al., 1991, Valenzuela et al., 1993).

9. Expresión de TrkB en el SNC

Entre los receptores de neurotrofinas, TrkB se expresa ampliamente en el SNC (Kaplan and Miller, 2000) y sus vías de señalización juegan un papel esencial en los procesos de supervivencia, diferenciación y plasticidad sináptica, durante el desarrollo y en el adulto (Bramham and Messaoudi, 2005). La complejidad de este receptor ya se advierte en su gen codificante (*Ntrk2*), localizado en el cromosoma 9q22 e inusualmente grande, con unos 590 kpb y 26 exones (Valent et al., 1997, Stoilov et al., 2002, Luberg et al., 2010). Este gen es capaz de codificar alrededor de 100 transcritos de ARN que originan al menos 36 isoformas potenciales mediante procesamiento alternativo, y el uso de múltiples promotores y sitios de poliadenilación (Stoilov et al., 2002, Luberg et al., 2010). Sin embargo, en humanos son cuatro las isoformas mayoritarias (**Fig. I6**): una isoforma completa de 145 kDa denominada TrkB-FL (*TrkB full-length*); dos isoformas truncadas TrkB-T1 y TrkB-Shc que carecen del dominio tirosina quinasa y, por tanto, son catalítica-

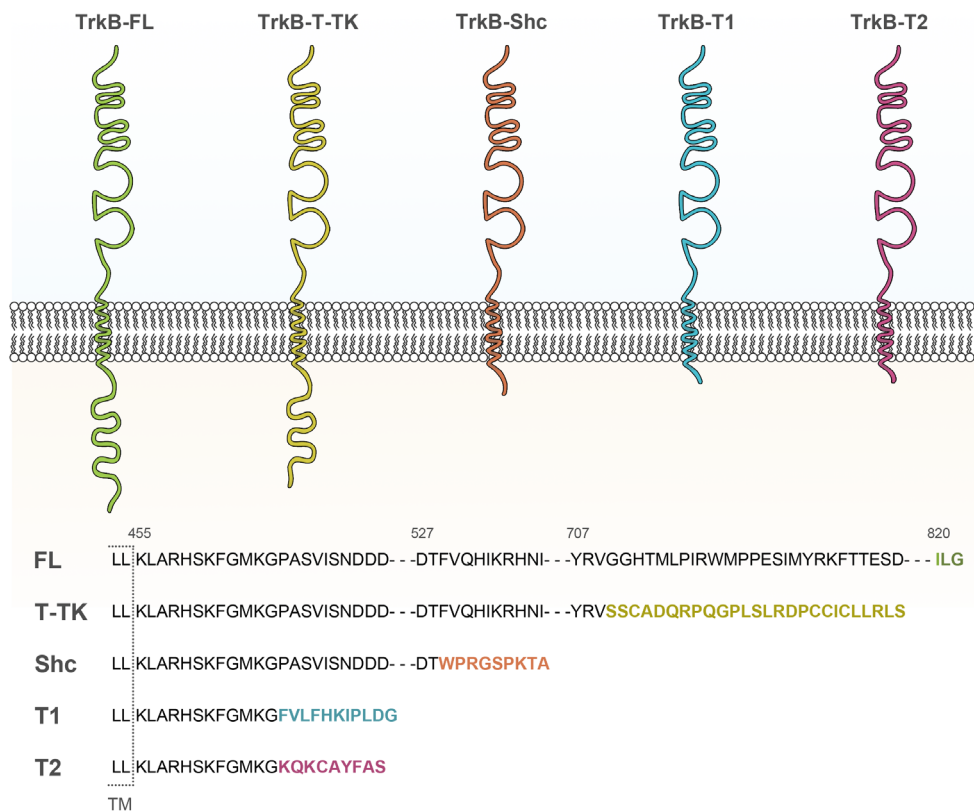


Figura I6. Isoformas de TrkB. Representación esquemática de las isoformas de TrkB detectadas en mamíferos. En humanos se expresan TrkB-FL, TrkB-T-TK, TrkB-Shc y TrkB-T1 mientras que TrkB-T2 sólo se ha observado en roedores. En la parte inferior se muestra una comparativa entre las regiones intracelulares de cada isoforma. La secuencia específica de cada una de ellas que difiere respecto TrkB-FL, la única isoforma catalíticamente activa, aparece resaltada en negrita. Se indica la posición aminoacídica según la proteína TrkB-FL expresada en humanos.

mente inactivas, y una forma TrkB-T-TK que conserva el dominio catalítico pero truncado lo que incapacita su autofosforilación (Luberg et al., 2010). De estas cuatro isoformas, en roedores sólo se han descrito TrkB-FL y TrkB-T1, aunque en ratas se ha detectado una forma truncada minoritaria denominada TrkB-T2 (Middlemas et al., 1991). Estructuralmente, las isoformas truncadas TrkB-T1 y TrkB-T2 contienen el mismo dominio extracelular, región transmembrana y primeros 12 aminoácidos intracelulares que la forma TrkB-FL, pero poseen una secuencia C-terminal específica de 11 y 9 aminoácidos, respectivamente (Middlemas et al., 1991, Eide et al., 1996). Por otro lado, TrkB-Shc es más larga que las anteriores e incluye un dominio de unión a la proteína adaptadora Shc (*Src homology 2 domain containing*) (Shelton et al., 1995, Stoilov et al., 2002).

10. Distribución de TrkB-FL y TrkB-T1 en el SNC de mamíferos

En el SNC de adultos, las isoformas de TrkB predominantes son el receptor catalíticamente activo y la forma truncada TrkB-T1, que se localizan en la mayoría de las regiones, aunque su patrón y nivel de expresión varía a lo largo de las diferentes etapas vitales. Por lo general, el receptor TrkB-FL aparece en estadios tempranos del desarrollo y sus niveles se mantienen relativamente estables, aunque sufren una ligera disminución asociada con el envejecimiento (Silhol et al., 2005). Por el contrario, la isoforma TrkB-T1 apenas está presente antes del nacimiento y su expresión aumenta en fases posteriores de maduración (Ohira et al., 1999, Luberg et al., 2010), coincidiendo con el periodo de eliminación del exceso de axones y la sinaptogénesis (Allendoerfer et al., 1994, Bracken and Turrigiano, 2009).

A nivel celular, TrkB-FL es específico de neuronas mientras que TrkB-T1 puede encontrarse además en células gliales (Ohira and Hayashi, 2003, Ohira et al., 2005b). Por tanto, en neuronas se pueden configurar homodímeros de TrkB-FL, TrkB-T1 o heterodímeros de ambas isoformas. Su distribución intracelular también presenta divergencias, a nivel sináptico TrkB-FL aparece tanto en las regiones pre- como postsinápticas, mientras que TrkB-T1 sólo tiene una pequeña representación en la zona presináptica (Pereira et al., 2006).

11. Activación y vías de señalización de TrkB-FL

La activación de TrkB-FL por las neurotrofinas (BDNF, NT 4/5 y NT 3) sigue el mismo patrón común que se asocia con los receptores tirosina quinasa (Friedman and Greene, 1999). La unión del ligando a la superficie extracelular provoca la dimerización del receptor (Jing et al., 1992), induciendo un cambio conformacional que aumenta la actividad catalítica del dominio intracelular. Esto permite la fosforilación de los residuos tirosina que se encuentran dentro del *loop* de activación (Y701, Y705 y Y706 según la secuencia de TrkB en rata, a la que nos vamos a referir a lo largo de esta Tesis), lo que conlleva a la transfosforilación de tirosinas

situadas fuera del dominio catalítico (Y515 y Y816), que actúan como sitios de anclaje para diversas moléculas adaptadoras (Cunningham and Greene, 1998). El reclutamiento y activación de los adaptadores y sus proteínas acompañantes dispara la activación de tres rutas de señalización principales que están ampliamente interconectadas (Huang and Reichardt, 2003) (**Fig. I7**).

11.1 Cascada de señalización de MAPK/ERK

La fosforilación del residuo Y515 de TrkB-FL permite el anclaje y activación de la proteína adaptadora Shc, y esto conduce a la formación de un complejo proteico en el que también participan Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*) y el intercambiador de nucleótidos SOS (*son of sevenless*). De este modo, se estimula la activación de la GTPasa Ras y, consecutivamente, una señalización transitoria de la vía c-Raf/MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*)/ERK (revisado en Reichardt, 2006). No obstante, la activación prolongada de ERK parece requerir el reclutamiento de una proteína adaptadora distinta, Frs2 (*Fibroblast receptor substrate-2*), al sitio Y515 fosforilado (Kao et al., 2001). El anclaje de Frs2 induce la unión de Crk que, a su vez, promueve la estimulación de Rap, iniciándose así la acción duradera de la ruta MAPK/ERK. Alternativamente, Crk puede unirse a Kidins220 mediante un residuo de tirosina que es fosforilado tras la unión del ligando a los receptores Trk. La estrecha relación entre Kidins220 y estos receptores de neurotrofinas, permite el reclutamiento de Crk a las proximidades de Trk y el comienzo de la cascada de eventos que conllevan a la activación de ERK (Arevalo et al., 2004). En cualquiera de los casos, la fosforilación de ERK promueve la supervivencia y la diferenciación neuronales a través del aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) y la activación del factor de transcripción CREB, entre otros (Bonni et al., 1999, Liu et al., 1999).

11.2 Cascada de señalización de PI3K-Akt

La proteína PI3K también se activa a través del reclutamiento de la proteína Shc al residuo fosforilado Y515 de TrkB-FL, lo que promueve la formación de un complejo con Grb2 y Gab1 (*GRB2-associated binding protein 1*). Alternativamente, esta quinasa también puede ser activada por Ras (Vaillant et al., 1999). La acción de PI3K da lugar a la translocación a la membrana plasmática y posterior activación de Akt que, a su vez, controla mediante fosforilación las actividades de varias proteínas importantes en la supervivencia neuronal (Yuan and Yankner, 2000, Brunet et al., 2001). Así, por ejemplo, Akt promueve la inactivación de sustratos como la proteína proapoptótica BAD (*Bcl-2 antagonist of cell death*), que regula directamente la cascada de las caspasas, o factores de transcripción tipo *forkhead* (*FKHR*), que promueven la expresión de múltiples proteínas proapoptóticas. Además, Akt media la fosforilación de I κ B que resulta en su degradación y la liberación del factor de transcripción pro-supervivencia NF- κ B (Datta et al., 1997, Foehr et al., 2000, Zheng et al., 2002).

11.3 Cascada de señalización de PLC γ

La fosforilación de la tirosina situada en posición más C-terminal de TrkB-FL, Y816, promueve el reclutamiento y activación de PLC γ (*phospholipase-C γ*) (Obermeier et al., 1993), que hidroliza fosfatidilinositol 4,5-difosfato produciendo diacilglicerol (DAG) e inositol-trifosfato (IP $_3$). La presencia de IP $_3$ media la liberación de Ca $^{2+}$ de los depósitos intracelulares, lo que activa moléculas dependientes de este ión como las CaMKs (*Ca $^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase*), la fosfatasa calcineurina y el factor prosupervivencia CREB. Adicionalmente, la liberación de Ca $^{2+}$ y la producción de DAG también estimula diversas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) que, consecutivamente, inducen la señalización de ERK vía Raf, así como la

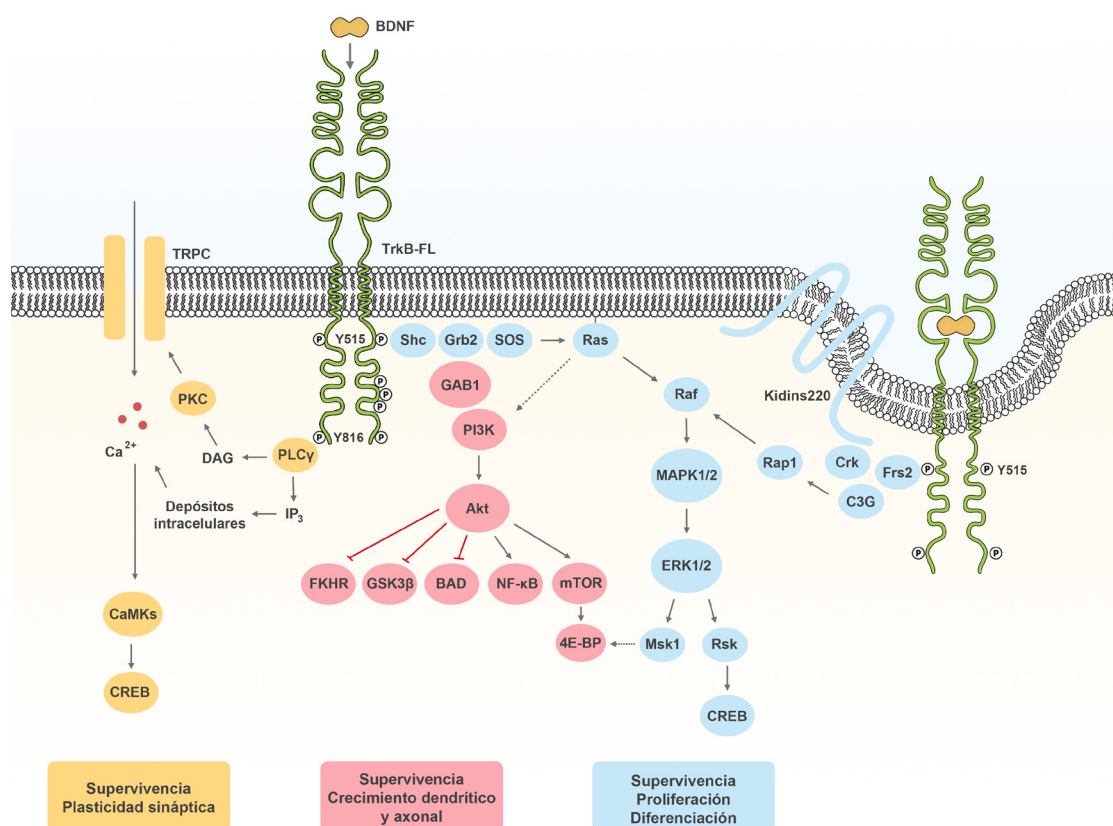


Figura I7. Principales cascadas de señalización de TrkB-FL. La unión de BDNF a TrkB-FL induce la dimerización y activación del receptor, desencadenando tres rutas principales de señalización: MAPK/ERK (azul), PI3K (rosa) y PLC γ (amarillo). La fosforilación de la Y515 está implicada en la activación transitoria, a través de Ras, o sostenida, mediante Rap1, de las quinasas ERK, así como de la vía de PI3K, ambas rutas relacionadas con la supervivencia y el crecimiento de las neuronas. El reclutamiento y activación de PLC γ a través de la fosforilación de la Y816 promueve igualmente la supervivencia neuronal y está involucrada en la LTP. C3G, *Crk SH3-domain binding GEF*; Msk1, *Mitogen and stress-activated protein kinase*; Rsk, *Ribosomal protein S6 kinase*; GSK3 β , *Glycogen synthase kinase 3 β* ; mTOR, *mammalian Target of Rapamycin*; 4E-BP, *eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein*. Adaptado de (Minichiello, 2009).

activación de canales catiónicos TRPC, que contribuyen al incremento de Ca^{2+} inducido por BDNF en los conos de crecimiento y sinapsis (Corbit et al., 1999, Minichiello et al., 2002). La elevación en los niveles de este ión incrementa la actividad de la adenilato ciclasa, que es necesaria para la formación de los complejos sinápticos TrkB-PSD95 (Ji et al., 2005), y la transcripción mediada por CREB (Nguyen et al., 1994, Shaywitz and Greenberg, 1999). Esta vía, a través del anclaje de PLC γ y la posterior fosforilación de CaMKIV y CREB, es la responsable de la modulación de la plasticidad sináptica ejercida por TrkB (Minichiello et al., 2002).

11.4 Transactivación independiente de neurotrofinas

Al igual que se ha descrito para otros receptores con actividad tirosina quinasa, los receptores TrkB pueden ser activados y promover diversas funciones celulares por mecanismos que no requieren la participación de las neurotrofinas (Lee and Chao, 2001). Estos mecanismos de transactivación pueden ser inducidos por un amplio rango de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), entre los que se incluyen el receptor 2A de adenosina (Lee and Chao, 2001, Lee et al., 2002), el de dopamina 1 (D1R) (Iwakura et al., 2008) y el de cannabinoides 1 (CB1R) (Lee and Chao, 2001, Lee et al., 2002, Berghuis et al., 2005, Iwakura et al., 2008). En contraposición a la activación mediada por neurotrofinas, la transactivación es un proceso relativamente lento y está mediado por proteínas que pertenecen a la familia de las quinasas Src (*v-src Rous sarcoma viral oncogene homolog*) (Lee and Chao, 2001, Rajagopal et al., 2004, Rajagopal and Chao, 2006, Huang and McNamara, 2010). Este proceso no está restringido a paradigmas *in vitro*, ya que estudios recientes demuestran que la presencia de EGF (*epidermal growth factor*) en neuronas corticales embrionarias y la señalización iniciada a través de su receptor EGFR puede inducir la activación de TrkB (Puehringer et al., 2013). Asimismo, los glucocorticoides (Jeanneteau et al., 2008), varios tipos de antidepresivos (Rantamaki et al., 2011) y el catión divalente zinc (Huang et al., 2008) también son capaces de transactivar TrkB *in vivo*. De hecho, la transactivación de este receptor mediada por zinc afecta a la transmisión sináptica mediante la modulación de la LTP en las fibras musgosas de la región CA3 del hipocampo (Huang et al., 2008).

12. Funciones de la isoforma truncada TrkB-T1

Las funciones fisiológicas de TrkB-T1 en el sistema nervioso no están completamente establecidas, siendo su papel como dominante negativo de la isoforma completa TrkB-FL uno de los mejor caracterizados (**Fig. 18**). En neuronas, pueden generarse heterodímeros entre ambas isoformas, lo que impide la transfosforilación de TrkB-FL y la consiguiente activación de sus vías de señalización (Knusel et al., 1994, Eide et al., 1996, Fryer et al., 1997, Haapasalo et al., 2001, Offenhauser et al., 2002). De hecho, gran cantidad de evidencias indican que el incremento en los niveles de la isoforma truncada reduce los efectos neuroprotectores de BDNF (Saarelainen

et al., 2000, De Wit et al., 2006). Sin embargo, la existencia de la región C-terminal específica de TrkB-T1, completamente conservada en todos los mamíferos estudiados, y el patrón de expresión de esta isoforma, tan abundante y diferente respecto al de TrkB-FL, sugieren un papel esencial de esta isoforma independiente de TrkB-FL. Una de estas funciones de TrkB-T1 es la de competir con TrkB-FL por la unión de BDNF, actuando como secuestrador de la neurotrofina del medio extracelular (Biffo et al., 1995, Fryer et al., 1997). Se ha propuesto que esta labor es ejercida fundamentalmente por la isoforma truncada presente en células gliales, y que este mecanismo regula la concentración local de neurotrofinas; acumulando BDNF cuando se encuentra en exceso, y liberándolo al medio en el momento y lugar que sea necesario (Alderson et al., 2000).

Asimismo, existen estudios que demuestran la implicación de TrkB-T1 en la morfología celular en neuronas y glía. En astrocitos, esta isoforma interacciona directamente con Rho GDI1 (*Rho GDP dissociation inhibitor 1*) (Ohira et al., 2005a, Ohira et al., 2006). Tras la unión de BDNF a TrkB-T1, Rho GDI se disocia e inhibe las Rho GTPasas (RhoA, Cdc42 y Rac1), produciendo una disminución en la actividad de varias de sus moléculas señalizadoras implicadas en la reorganización del citoesqueleto, que altera la morfología de los astrocitos (Ohira et al., 2005a, Ohira et al., 2006). De igual manera, esta isoforma de TrkB regula la morfología astrocitaria en la capa I del neocortex de rata adulta (Ohira et al., 2007). Además, se ha observado que la estimulación de TrkB-T1 provoca la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares en astrocitos (Rose et al., 2003) y la activación mediada por una proteína G de PKC en las células neuronales troncales, promoviendo su diferenciación hacia astrocitos e inhibiendo la neurogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Cheng et al., 2007). Por otra parte, TrkB-T1 induce el crecimiento de filopodios mediante un mecanismo independiente de BDNF en células de neuroblastoma (Haapasalo et al 1999), así como en cultivos primarios de hipocampo (Hartmann et al., 2004), función que parece ser regulada por p75^{NTR} (Hartmann et al., 2004, Michaelsen et al., 2010). Asimismo, la acción de TrkB-T1 sobre la morfología celular también se ha demostrado *in vivo* mediante el análisis de ratones deficientes para esta isoforma. A pesar de que estos animales presentan un fenotipo normal incluso en el patrón espacio-temporal de expresión de TrkB-FL (Dorsey et al., 2006), muestran un incremento en los comportamientos de ansiedad que se corresponden con anomalías en las neuronas de la amígdala basolateral, concretamente alteraciones en la longitud y complejidad de las arborizaciones en dendritas distales respecto del soma (Yacoubian and Lo, 2000, Carim-Todd et al., 2009).

Por último, estudios recientes han propuesto que determinadas condiciones patológicas como el traumatismo de la médula espinal provocan un aumento en los niveles de TrkB-T1, que está asociado con un incremento en la expresión de proteínas de ciclo celular y la activación de astrocitos y microglía, que contribuye al dolor neuropático (Wu et al., 2013). Estos datos sugieren que TrkB-T1 contribuye al desarrollo de esta situación patológica mediante la regulación del ciclo celular.

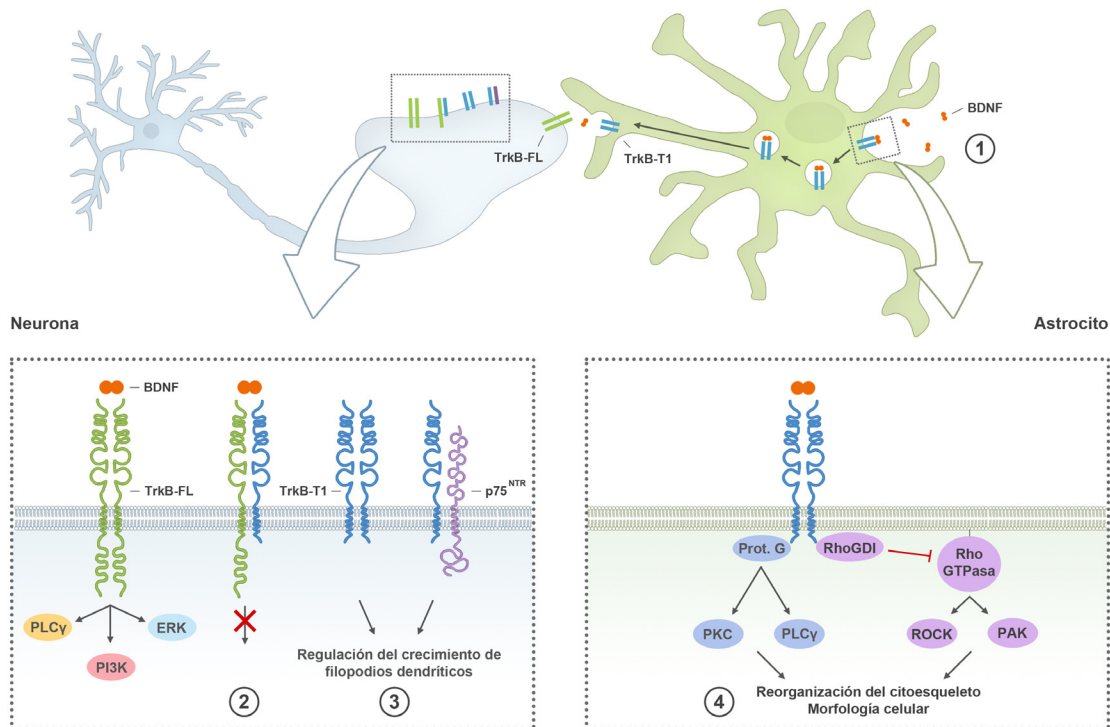


Figura I8. Funciones de TrkB-T1 en astrocitos y neuronas. 1. Los homodímeros de TrkB-T1 tienen la capacidad de unirse a BDNF e internalizarse. En células gliales, éste podría ser un mecanismo para regular la concentración de esta neurotrofina en el medio extracelular. 2. La función más caracterizada de TrkB-T1 en neuronas es la de dominante negativo de TrkB-FL, derivada de su capacidad de formar heterodímeros y truncar las correspondientes vías de señalización de TrkB-FL. 3. En neuronas, TrkB-T1 puede influir sobre la morfología celular a través de un mecanismo independiente de BDNF que parece requerir la acción de p75^{NTR}. 4. En los astrocitos, la unión de BDNF a TrkB-T1 permite la liberación de Rho GDI que interacciona directamente con el receptor. Esta proteína es un inhibidor de las Rho GTPasas que están implicadas en la reorganización del citoesqueleto. Asimismo, TrkB-T1 también participa en la morfología astrocitaria mediante la activación de PKC y PLCγ. Adaptado de (Fenner, 2012).

13. Regulación de TrkB y su señalización: transporte axonal, reciclaje y degradación

TrkB es responsable de una gran variedad de funciones neuronales y esto, en parte, es posible gracias a una estricta regulación de los niveles del receptor en la membrana plasmática y una compartimentalización que permite diferentes tipos de señalización dependiendo de su localización. Tras la unión con su ligando, los receptores Trk son internalizados por endocitosis en forma de complejos receptor-ligando que permanecen activos (**Fig. I9**). Por tanto, la señalización mediada por estos receptores no sólo ocurre en la membrana plasmática sino que puede continuar tras su internalización e, incluso, las rutas activadas son diferentes en función

de su ubicación. Por ejemplo, en la superficie celular se produce la activación transitoria de la vía de la MAPK a través de la GTPasa Ras, mientras que los complejos Trk endocitados promueven una activación sostenida de esta misma vía asociada a la acción de la GTPasa Rap1 (Wu et al., 2001, Chowdary et al., 2012). La internalización de los receptores es un proceso regulado por ubiquitinación (Geetha et al., 2005, Arevalo et al., 2006), que puede llevarse a cabo por mecanismos dependientes de clatrina (Grimes et al., 1997, Beattie et al., 2000, Zheng et al., 2008), caveolina (Wu et al., 1997, Bilderback et al., 1999, Peiro et al., 2000, Suzuki et al., 2004) o por macropinocitosis (Valdez et al., 2005). Independientemente del mecanismo, todos estos procesos generan un endosoma temprano conocido como endosoma de señalización

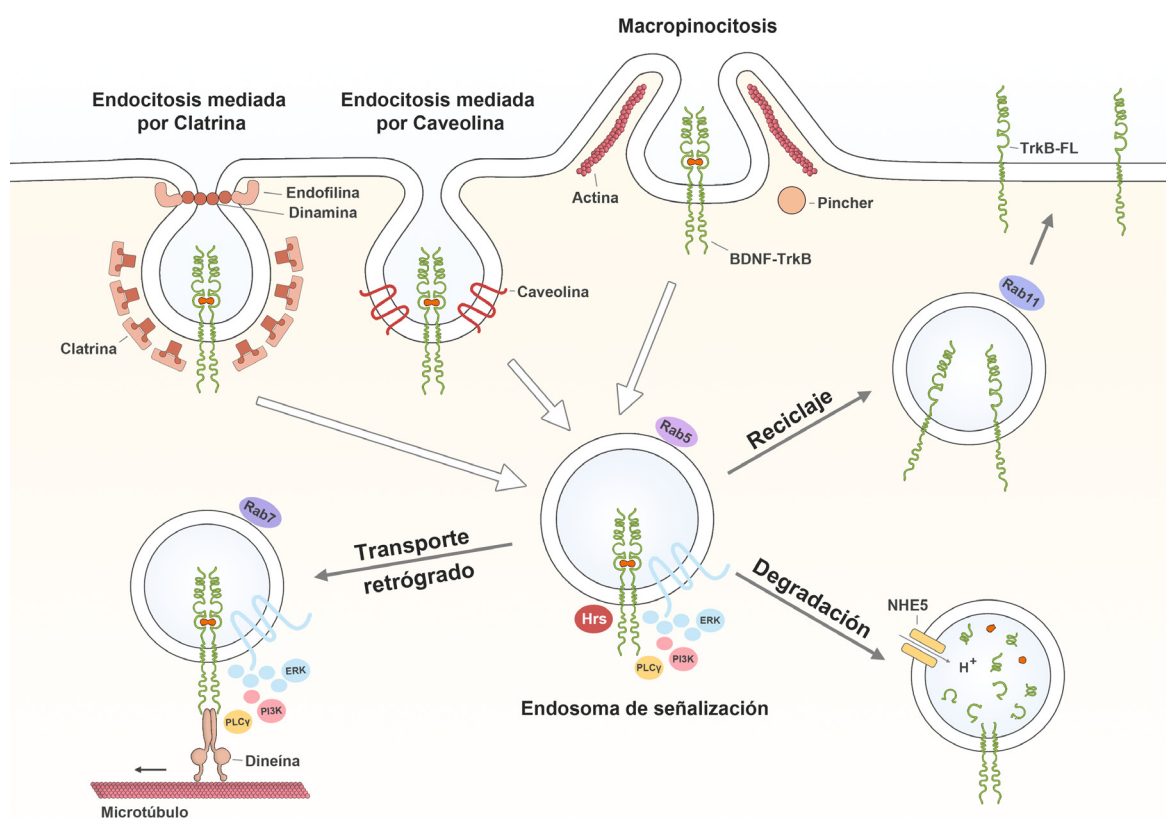


Figura I9. Destino celular de los receptores TrkB-FL tras su activación e internalización. Los complejos BDNF-TrkB-FL se endocitan fundamentalmente a través de un mecanismo dependiente de clatrina (Zheng et al., 2008), aunque también lo hacen mediante macropinocitosis regulada por la proteína Pincher (Valdez et al., 2005). Este receptor también puede interaccionar con caveolina (Gupta et al., 2012) y esta presente en los lipid rafts (Wu et al., 1997, Suzuki et al., 2004) lo que sugiere que podría internalizarse por este mecanismo independiente de clatrina, tal y como hace TrkA. En el interior celular se localizan en endosomas tempranos, donde los receptores permanecen activos unidos a sus ligandos y a diversas proteínas interaccionantes, por lo que este compartimento se ha denominado endosoma de señalización. Estas estructuras son entidades dinámicas que van modificando sus componentes en función de su destino celular. De este modo, los receptores pueden transportarse retrógradamente hacia el soma celular, seguir la vía lisosomal degradativa o ser dirigidos hacia la membrana plasmática para su reciclaje. NHE5, *Na⁺/H⁺ exchanger 5*. Adaptado de (Zweifel et al., 2005).

(Grimes et al., 1996), puesto que el receptor permanece activo unido a su ligando y muchas de sus proteínas interaccionantes también se localizan en estos compartimentos. Desde esta estructura, los complejos receptor-ligando pueden seguir diferentes destinos: un transporte retrógrado hacia el soma neuronal dependiente de dineína, el reciclaje hacia membrana plasmática o la degradación lisosomal (Dechant, 2001). Cada una de estas rutas está caracterizada por un endosoma con una identidad diferente que es conferida, en gran medida, por la familia de proteínas GTPasas Rab. De este modo, se han observado tres poblaciones principales: endosomas tempranos asociados con Rab5; endosomas tardíos que poseen Rab7 y Rab9, y endosomas implicados en el reciclaje, definidos por la presencia de Rab4 y Rab11 (revisado en Stenmark, 2009, Hutagalung and Novick, 2011). Además de esta familia de proteínas, la acidificación del pH luminal juega un papel esencial en la maduración de los endosomas y permite la disociación del complejo receptor-ligando, necesaria para detener su señalización y la reutilización del receptor en membrana o para que este sufra degeneración lisosomal (Diering and Numata, 2014). En el caso de TrkB, el mecanismo de reinserción en la superficie celular es diferente para cada isoforma. Así, el reciclaje del receptor TrkB-FL endocitado está regulado por su actividad tirosina quinasa y la interacción con la proteína Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) mediante un mecanismo dependiente de Rab11 (Huang et al., 2009, Lazo et al., 2013), de modo que el incremento de la actividad sináptica aumenta el reciclaje de este receptor a la superficie celular (Huang et al., 2013). Por el contrario, la isoforma truncada TrkB-T1 es devuelta a la membrana de manera más eficiente que TrkB-FL por un mecanismo independiente de la actividad neuronal, mediado por endosomas que poseen Rab4 (Huang et al., 2009).

14. Alteraciones patológicas de la vía BDNF/TrkB

Una regulación adecuada de la activación de TrkB es crítica en el funcionamiento celular. Por tanto, no resulta sorprendente que alteraciones en los niveles de este receptor y su ligando BDNF sean un factor común que subyace al curso y desarrollo de los síntomas clínicos de numerosas patologías del SNC, incluyendo enfermedades neurodegenerativas y trastornos mentales (Dawbarn and Allen, 2003).

14.1 Enfermedad de Alzheimer

En la enfermedad de Alzheimer, la cantidad de ARNm y proteína BDNF disminuyen severamente en el hipocampo y corteza frontal (Phillips et al., 1991, Connor et al., 1997, Ferrer et al., 1999), incluso en las etapas preclínicas de la enfermedad (Peng et al., 2005). Este efecto es consecuencia de la acumulación del péptido β -amiloide que induce, además, un desequilibrio en las isoformas de TrkB, reduciéndose los niveles de la isoforma catalíticamente activa al tiempo que se incrementan los de la isoforma truncada TrkB-T1 (Connor et al., 1996, Ferrer et al., 1999, Kemppainen et al., 2012). Adicionalmente, el péptido β -amiloide atenúa aún más la seña-

lización neurotrófica al perturbar el transporte axonal retrógrado de BDNF (Poon et al., 2011). Por lo tanto, el deterioro en la señalización BDNF/TrkB puede contribuir activamente a la pérdida celular y sináptica, así como a los déficits de memoria característicos de esta enfermedad.

14.2 Enfermedad de Parkinson

En pacientes con la enfermedad de Parkinson, la expresión de BDNF también se encuentra reducida en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (Parain et al., 1999, Howells et al., 2000), cuya pérdida es la principal responsable de esta enfermedad. Asimismo, en esta misma región existe un desbalance en la distribución de las isoformas de TrkB (Fenner et al., 2014) y se ha demostrado que la reducción crónica de la señalización de TrkB-FL causa degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas (Zaman et al., 2004, Baydyuk et al., 2011). Además, en modelos animales de Parkinson, el tratamiento con BDNF previene la muerte de estas células y mejora la reinervación estriatal (Levivier et al., 1995, Tsukahara et al., 1995), lo que sugiere la participación directa de esta vía en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.

14.3 Enfermedad de Huntington

Una de las primeras alteraciones que se producen en la enfermedad de Huntington es la reducción de los niveles de BDNF en el estriado, estructura subcortical que participa en el control del movimiento y la selección de acciones (revisado en Gerfen and Surmeier, 2011). Esta estructura apenas expresa el citado factor neurotrófico y depende de su transporte procedente de la corteza cerebral (Altar et al., 1997). Como consecuencia de la mutación en la proteína huntingtina, característica de esta enfermedad, se reducen la expresión de BDNF en la corteza cerebral y su distribución al estriado, lo que aumentaría la vulnerabilidad de esta región (Zuccato et al., 2001, Gauthier et al., 2004). Paralelamente, la reducción en las neuronas estriatales de los niveles totales y de superficie de TrkB-FL, así como de la proteína adaptadora Shc, da lugar a una reducción específica de la activación de la vía Ras/MAPK/ERK1 (Gines et al., 2010). En conjunto, la reducción en los niveles de TrkB-FL y su ligando, junto con un deterioro en el reciclaje y transporte endosomal de este receptor (Li et al., 2010, Liot et al., 2013), afectan negativamente la activación de sus rutas de señalización. No obstante, un estudio reciente ha demostrado que los defectos en la señalización neurotrófica se deben a una modificación en el patrón de respuesta a BDNF por parte de TrkB-FL y p75, y que estos cambios preceden a los déficits en la cantidad y transporte del receptor y su ligando (Plotkin et al., 2014). De este modo, la reducción en la plasticidad sináptica de las neuronas estriatales en las etapas tempranas de la enfermedad sería atribuible al aumento en la señalización de p75 a través de PTEN, que resulta en la alteración de las vías PI3K y Akt a pesar de que la respuesta de TrkB a su ligando es todavía correcta en estos estadios.

14.4 Depresión

Muchas evidencias indican que la depresión puede estar asociada con la incapacidad de los sistemas neuronales de exhibir plasticidad adaptativa y resaltan la reducción en la señalización neurotrófica como uno de los mecanismos centrales de esta enfermedad, datos recogidos en la denominada hipótesis neurotrófica de la depresión [revisado en (Dwivedi et al., 2009)]. El estrés, considerado un importante factor de riesgo de la depresión, disminuye los niveles de BDNF y su señalización en el hipocampo y corteza cerebral (Smith et al., 1995, Nestler et al., 2002). Los estudios con antidepresivos también avalan esta hipótesis, puesto que el tratamiento crónico con estos compuestos incrementa los niveles en la sangre de pacientes deprimidos de BDNF (Brunoni et al., 2008, Sen et al., 2008), TrkB (Nibuya et al., 1995). Además, su administración induce incluso una rápida activación del receptor TrkB y la vía de señalización mediada por PLC γ (Rantamaki et al., 2007). Paralelamente, también se ha observado que los efectos terapéuticos de los antidepresivos requieren el funcionamiento de la vía BDNF/TrkB (Duman and Monteggia, 2006, Castren and Rantamaki, 2010), y que el suministro de BDNF exógeno proporciona un efecto similar al de estos compuestos en modelos animales de depresión (Siuciak et al., 1997, Hoshaw et al., 2005). Otro punto que refuerza esta hipótesis es que los individuos que poseen el polimorfismo BDNF Val66Met, que causa una menor liberación de esta proteína en el cerebro, son más susceptibles a los efectos negativos del ambiente, y esto se asocia con una mayor predisposición a sufrir depresión (Kim et al., 2007). La reducción de los niveles de BDNF y de las dos principales isoformas de TrkB también es evidente en sujetos que han cometido suicidio (Dwivedi et al., 2003, Ernst et al., 2009, Banerjee et al., 2013), en los que la incidencia de haber padecido depresión mayor es muy elevada. La disminución de estas isoformas se ha relacionado en estos individuos con un descenso de la proteína ligasa E3 c-Cbl, implicada en la estabilización de TrkB-FL por ubiquitinación (Pandya et al., 2014), y con un incremento del microRNA Hsa-miR-185* encargado de la regulación en la expresión de TrkB-T1 (MauSSION et al., 2012).

14.5 Esquizofrenia

Diversos estudios han demostrado que los individuos que padecen esquizofrenia poseen menores niveles circulantes de BDNF (Chen da et al., 2009, Issa et al., 2010). Al mismo tiempo, en corteza prefrontal se produce una disminución en la cantidad de TrkB-FL y su ligando (Weickert et al., 2003, Emamian et al., 2004, Ray et al., 2014), así como en las de proteínas implicadas en su señalización como Akt (Weickert et al., 2003, Emamian et al., 2004, Ray et al., 2014). Por el contrario, las isoformas truncadas TrkB-Shc y TrkB-T1 experimentan un incremento en el cerebro de sujetos esquizofrénicos (Weickert et al., 2005, Wong et al., 2013).

14.6 Isquemia cerebral

El daño cerebral isquémico desequilibra los niveles de las isoformas de TrkB en el núcleo y la penumbra del infarto, disminuyendo drásticamente la abundancia de TrkB-FL y aumentando considerablemente la isoforma T1 en modelos animales (Ferrer et al., 2001, Vidaurre et al., 2012) y en necropsias de pacientes de ACVs (Ferrer et al., 2001, Vidaurre et al., 2012). Estas alteraciones son consecuencia de la excitotoxicidad que tiene lugar tras el daño isquémico (**Fig. I10**), donde una activación excesiva de la proteasa calpaína procesa TrkB-FL, dando lugar a receptores truncados no funcionales, y una regulación transcripcional inversa del gen *Ntrk2* favorece la expresión de la isoforma T1 (Vidaurre et al., 2012).

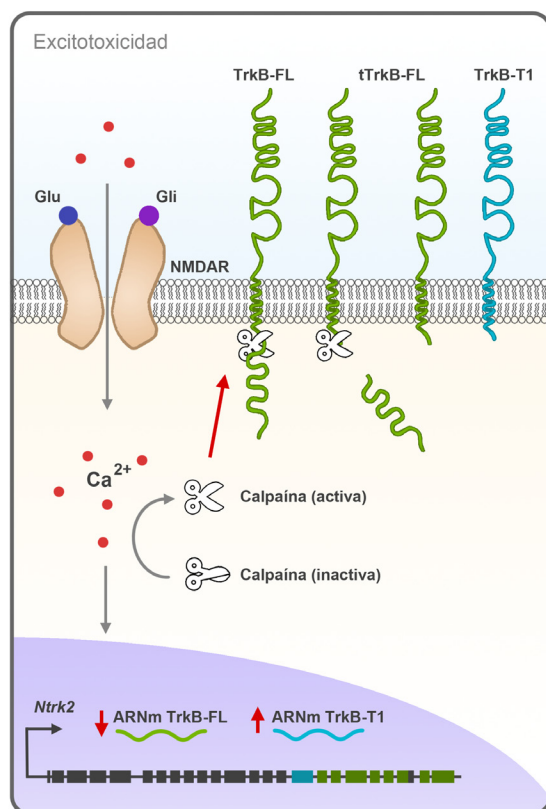


Figura I10. Regulación de TrkB en excitotoxicidad e isquemia cerebral. La sobreactivación de los NMDARs induce una entrada masiva de Ca^{2+} en las neuronas que conlleva la activación de calpaína. Esta enzima procesa al receptor TrkB-FL en la región yuxtamembrana dando lugar a un receptor truncado con un tamaño similar al TrkB-T1, que podría actuar como dominante negativo. Asimismo, las condiciones excitotóxicas invierten el patrón transcripcional del gen *Ntrk2*, disminuyendo la generación del ARNm de TrkB-FL y aumentando el de TrkB-T1, lo que incrementa los niveles de proteína de esta isoforma. Adaptado de (Vidaurre, 2011).

15. Restauración de la vía BDNF/TrkB como herramienta neuroprotectora

El papel clave que ejerce BDNF en la supervivencia neuronal y la disminución generalizada que experimenta en una gran cantidad de patologías del SNC convierten a esta molécula en un candidato potencial para el tratamiento de estas enfermedades. A pesar de que su acción terapéutica ha sido demostrada reiteradamente en gran cantidad de estudios con modelos animales, los ensayos clínicos con BDNF han fracasado debido a su escasa capacidad para atravesar la BHE,

su baja estabilidad relativa, su exigua difusión y otras limitaciones (Ochs et al., 2000, Tuszynski et al., 2005). Con el fin de superar estos problemas, se han desarrollado compuestos alternativos que imitan los efectos de BDNF, entre los que destaca la 7,8-dihidroxi-flavona que actúa como un potente agonista de TrkB y se revela como una herramienta terapéutica potencial (Jang et al., 2010).

No obstante, en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas y trastornos mentales la disminución de BDNF va acompañada de un desbalance en los niveles de sus receptores y una alteración de sus vías de señalización. Por tanto, es necesario reconsiderar el uso por sí solos de BDNF u otros agonistas de TrkB como agentes terapéuticos, y explorar nuevas dianas que puedan restablecer el funcionamiento de estas vías. Esto es particularmente importante en enfermedades con un componente excitotóxico ya que, en este caso, el procesamiento enzimático de TrkB-FL da lugar a un receptor con la facultad de unirse a su ligando pero incapaz de desencadenar su respuesta celular pro-supervivencia (Vidaurre et al., 2012). De hecho, varios estudios han demostrado que la recuperación de los niveles de las isoformas de TrkB tiene capacidad neuroprotectora. En un modelo animal de síndrome de Down, en el que se produce el desbalance de las isoformas de TrkB en neuronas hipocámpicas, la restauración de los niveles normales de TrkB-T1 es capaz de rescatar a esas neuronas de la muerte y de recuperar la señalización por BDNF y los niveles normales de calcio (Dorsey et al., 2006). De igual manera, la sobreexpresión del receptor TrkB-FL en un modelo murino de Alzheimer alivia los déficits en memoria espacial, mientras que el incremento por manipulación genética de TrkB-T1 exacerba aún más estas alteraciones (Kemppainen et al., 2012). Por último, en un modelo celular de excitotoxicidad, la reparación del desequilibrio patológico de las isoformas de TrkB mejora la viabilidad neuronal (Vidaurre et al., 2012). Por consiguiente, el desarrollo de nuevas estrategias basadas en el bloqueo de aquellos mecanismos que generan anomalías en la expresión y función de los receptores TrkB tiene un gran interés y permitirá generar herramientas con mayor potencial terapéutico que las exploradas hasta ahora.

OBJETIVOS

El principal propósito del presente trabajo es el desarrollo de nuevas herramientas neuroprotectoras y diagnósticas útiles para la excitotoxicidad y la isquemia cerebral, diseñadas en base a las alteraciones patológicas que sufren los receptores de neurotrofinas TrkB en dichos procesos. Con esta finalidad, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Profundizar en los mecanismos de procesamiento de TrkB inducidos en condiciones de excitotoxicidad, caracterizando los fragmentos producidos en un modelo celular de excitotoxicidad así como en modelos animales de isquemia cerebral.
2. Desarrollar estrategias neuroprotectoras capaces de prevenir el procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad.
3. Desarrollar herramientas neuroprotectoras dirigidas a contrarrestar los efectos del aumento de TrkB-T1 en condiciones de excitotoxicidad.
4. Analizar los fragmentos de TrkB en sangre y LCR de modelos animales y pacientes de isquemia cerebral con el fin de identificar nuevos biomarcadores de la lesión cerebral.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras biológicas y su manipulación

1.1 Cultivos celulares

1.1.1 Cultivos primarios de neuronas corticales de rata

Los cultivos primarios de neuronas corticales se prepararon a partir de embriones de rata Wistar a día E18 según protocolos previamente descritos (Rose et al., 1993) con algunas modificaciones. Todos los procedimientos utilizados en el desarrollo de esta Tesis que requerían el uso de animales cumplieron con la ley de la Comunidad Europea 86/609/EEC y el Real Decreto

Reactivo	Función	Concentración de uso	Tiempo de tratamiento	Casa comercial
NMDA	Agonista NMDARs	100 μ M	0.5 – 6 h	Tocris Bioscience
Glicina	Coagonista NMDARs	10 μ M	0.5 – 6 h	Sigma-Aldrich
DL-AP5	Antagonista NMDARs	200 μ M	24 h	Tocris Bioscience
CiIII	Inhibidor calpaína	10 μ M	0.5 – 1 h pretratamiento	Calbiochem
Calpeptina	Inhibidor calpaína	10 μ M	0.5 – 1 h pretratamiento	Calbiochem
Lactacistina	Inhibidor proteasoma	20 μ M	1 h pretratamiento	Calbiochem
BDNF	Ligando receptores neurotrofinas TrkB	100 ng/ml	2 h	PeprroTech
TAPI-2	Inhibidor metaloproteinasas	10 μ M	0.5 h pretratamiento	Peptides International
GM6001	Inhibidor metaloproteinasas	10 μ M	0.5 h pretratamiento	Calbiochem
APMA	Activador metaloproteinasas	100 μ M	0.5 – 6 h	Calbiochem
Compound E	Inhibidor γ -secretasas	1 μ M	0.5 h pretratamiento	Calbiochem
Wortmannin	Inhibidor PI3K	100 nM	1 h pretratamiento	Ascent Scientific
UO126	Inhibidor MEK 1/2	300 nM	1 h pretratamiento	Calbiochem
U-73122	Inhibidor PLC	5 μ M	1 h pretratamiento	Sigma-Aldrich

Tabla M1. Inhibidores y activadores de receptores y enzimas utilizados en este trabajo. NMDA, N-metil-D-aspartato; DL-AP5, ácido 2-amino fosfopentanoico; CiIII, inhibidor III de calpaína; TAPI-2, TNF protease inhibitor 2; APMA, acetato de 4-aminofenilmercurio.

RD53/2013 y fueron aprobados por el Comité de Ética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid. Tras la retirada de las meninges, las cortezas cerebrales se diseccionaron y disociaron mecánicamente con ayuda de una pipeta. A continuación, las células obtenidas tras una centrifugación de 5 min a 1500 rpm se resuspendieron en medio de cultivo *Minimum Essential Medium* (MEM, ref. 21090-022, Life technologies) suplementado con glucosa 22.2 mM, glutamax 2 mM (Life technologies), suero fetal bovino (FBS, Life technologies) 5%, suero de caballo (HS, Life technologies) 5%, B-27 0.1% (Life technologies), penicilina (100 U/ml, Life technologies) y estreptomicina (100 µg/ml, Life technologies), y se sembraron a alta densidad (0.3×10^6 células/cm²) sobre placas o cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) y laminina (4 µg/ml, Sigma-Aldrich). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 13 días *in vitro* (DIVs). Con objeto de inhibir el crecimiento de las células gliales, se añadió al medio de cultivo el agente intercalante en el ADN AraC (citosa-β-D-arabino-furanósido, 10 µM, Sigma-Aldrich) a los 7 DIVs.

Las células se trataron o pretrataron a 13 DIVs, según se indica, con los diferentes reactivos detallados en la **Tabla M1** añadidos directamente al medio de cultivo, a no ser que se indique lo contrario.

Adicionalmente, los cultivos celulares fueron incubados con péptidos sintéticos (Immunostep y GenScript) que contienen la secuencia aminoacídica 47-57 de la proteína transactivadora Tat del VIH, responsable de las propiedades de permeabilidad celular de dicha proteína, unida covalente-

Péptido	Origen	Posición aa	Secuencia
TMyc	c-Myc	408 - 421	YGRKKRRQRRRAEEQKLISEEDLLR
TFL ₄₅₇	TrkB-FL	457 - 471	YGRKKRRQRRRHSGKFGMKGPASVIS
TFL ₄₈₂	TrkB-FL	482 - 495	YGRKKRRQRRRHISNGSNTTPSSSEG
TFL ₅₁₈	TrkB-FL	518 - 532	YGRKKRRQRRRITNSQLKPDFTVQHI
TFL ₅₄₁	TrkB-FL	541 - 555	YGRKKRRQRRRELGEAGFGKVFLAE
TFL ₆₃₉	TrkB-FL	639 - 652	YGRKKRRQRRRAEGNPPTLTQSQM
TT1	TrkB-T1	466 - 476	YGRKKRRQRRRPPFVLFHKKIPLDG
NA-1	GluN2B	1474 - 1482	YGRKKRRQRRRPPKLSSIESDV

Tabla M2. Péptidos Tat utilizados en este trabajo. Los péptidos diseñados contenían la región de la proteína Tat responsable de sus propiedades de permeabilidad (en cursiva y gris) unida a las posiciones aminoacídicas mostradas correspondientes a las proteínas de rata indicadas.

mente consecuencias procedentes de distintas proteínas, tal y como se indica en la **Tabla M2**. Para los estudios de inmunofluorescencia, los péptidos TMyc y TT1 fueron conjugados con FITC mediante reacción con sus grupos amino. Todos los péptidos utilizados fueron de pureza superior al 90%.

1.1.2 Cultivos de células PC12

La línea celular PC12 derivada de un feocromocitoma de rata se mantuvo en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, ref. 41966-052, Life technologies) suplementado con 7.5% de FBS, 7.5% de HS, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), a 37°C en un ambiente del 5% de CO₂ y 95% de humedad.

1.1.3 Cultivos de células HEK293t

La línea celular de riñón embrionario humano HEK293T fue cultivada en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), y mantenida a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

1.1.3.1 Transfección transitoria de células HEK293t

Las células HEK293t fueron sembradas en placas de 6 pocillos y 24 h después, al alcanzar una confluencia del 70-80%, el medio de cultivo fue sustituido por OptiMEM (ref. 31985-047, Life technologies), con el fin de reducir la cantidad de suero presente y mejorar la acción de los liposomas. Las células fueron entonces transfectadas con 2.5 µg de ADN por pocillo utilizando Lipofectamina 2000 (Life technologies), siguiendo las indicaciones del fabricante. Adicionalmente, cultivos controles fueron sometidos a las mismas condiciones pero sin añadir plásmido. Una vez transcurridas 4 h desde el inicio de la transfección, el medio con ADN/liposomas fue sustituido por medio DMEM suplementado como anteriormente y los cultivos mantenidos durante 24 h adicionales, momento en el que se realizaron los tratamientos con BDNF (100 ng/ml).

1.2 Vectores lentivirales

Todos los vectores lentivirales utilizados en este trabajo (**Tabla M3**) fueron generados a partir del plásmido LentiLox 3.7 (Rubinson et al., 2003), modificados para dirigir la expresión neuroespecífica de uno o dos genes en poblaciones mixtas de neuronas y células gliales (Gascon et al., 2008). Todos ellos tuvieron en común que la expresión proteica estaba regulada por el promotor del gen humano de la proteína neuronal sinapsina I (pSyn) y que, tras la secuencia de cada uno de los ADNs complementarios (ADNc), se encontraba una secuencia estabilizadora WPRE (*Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element*), capaz de estimular la expresión de los genes heterólogos (**Fig. M1**).

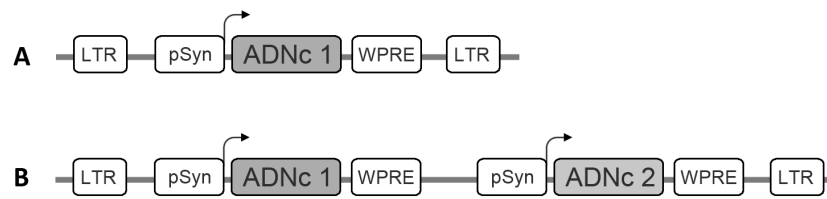


Figura M1. Esquema representativo de los vectores lentivirales utilizados en este trabajo. **A**, Vectores que expresan de forma constitutiva un único ADNc bajo el control del promotor neuroespecífico de la sinapsina humana. **B**, Vectores duales con dos promotores de sinapsina que dirigen la expresión de dos proteínas en neuronas. LTR, *long terminal repeats*.

La generación de los vectores **LV-HA-TrkB-FL-Mt-GFP** y **LV-HA-TrkB-FL-Mt/2xmiT1** precisó un primer paso de mutagénesis dirigida por el método *Quick-change Mutagenesis* (Stratagene) utilizando como molde el plásmido pBlueScript-HA-TrkB-FL. Esta construcción fue obtenida previamente incorporando el ADNc de HA-TrkB-FL procedente de LV-HA-TrkB-FL/GFP en el vector pBlueScript II SK+ (cedido amablemente por el Dr. Jaime Renart, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid, España). Para la mutagénesis dirigida, las reacciones de amplificación se realizaron con el oligonucleótido 5'-GGG TAA CCC GCC CAC CGA **CTT CAT CGA TTG GGA** GAT GCT GCA CAT CGC TC y su complementario 5'- GAG CGA TGT GCA GCA TCT **CCC AAT CGA TGA AGT** CGG TGG GCG GGT TAC CC, que introdujeron una diana de corte para la enzima de restricción *Clal* (subrayado) y la sustitución nucleotídica (en naranja) correspondiente a la secuencia aminoacídica 646-651 de la proteína TrkB-FL de rata. Posteriormente, se realizó el subclonaje en los vectores LV-HA-TrkB-FL-GFP y LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1 sustituyendo su secuencia de HA-TrkB-FL por la mutada previamente en el vector pBlueScript. El sitio de restricción generado fue utilizado como primer criterio para verificar la mutación del ADNc codificante para TrkB-FL, que fue posteriormente confirmada mediante secuenciación.

El vector **LV-HA-TrkB-T1/GFP** fue obtenido mediante la incorporación al plásmido LV-TrkB-T1/GFP (Vidaurre, 2011) de la secuencia codificante del epítipo HA, presente en LV-HA-TrkB-FL/GFP.

El plásmido **LV-HA-TrkB-T1-GFP** fue generado a partir del vector dual LV-HA-TrkB-FL/GFP utilizando las dianas BstEII y XmaI para sustituir la secuencia codificante de la región C-terminal de TrkB-FL, el fragmento que contiene la primera secuencia WPRE y el segundo promotor de sinapsina, por la secuencia codificante del extremo C-terminal de TrkB-T1, procedente del vector LV-HA-TrkB-T1/GFP. El plásmido resultante contiene el ADNc de TrkB-T1 seguido por la secuencia de GFP en fase correcta de lectura, de manera que el promotor de sinapsina regula la expresión de una proteína de fusión TrkB-T1-GFP en la que 9 aminoácidos (PGLALPVAT) separan ambas secuencias proteicas.

Vector	Proteína 1	Proteína 2	Referencia
LV-GFP	GFP	-	(Gascon et al., 2008)
LV-HA-TrkB-FL-GFP	TrkB-FL con HA en extremo Nt fusionada con GFP en región Ct	-	(Vidaurre, 2011)
LV-HA-TrkB-FL Mt-GFP	TrkB-FL Mt con HA en extremo Nt fusionada con GFP en región Ct	-	
LV-HA-TrkB-T1-GFP	TrkB-T1 con HA en extremo Nt fusionada con GFP en región Ct	-	
LV-DsRed/GFP	DsRed	GFP	(Gascon et al., 2008)
LV-HA-TrkB-FL/GFP	TrkB-FL con HA en extremo Nt	GFP	(Vidaurre et al., 2012)
LV-HA-TrkB-T1/GFP	TrkB-T1 con HA en extremo Nt	GFP	
LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1	TrkB-FL con HA en extremo Nt	2 pre-miARNs específicos de TrkB-T1	(Vidaurre et al., 2012)
LV-HA-TrkB-FL Mt/2xmiT1	TrkB-FL Mt con HA en extremo Nt fusionada con GFP en región Ct	2 pre-miARNs específicos de TrkB-T1	

Tabla M3. Vectores lentivirales utilizados en este trabajo. Los plásmidos codifican para una o dos proteínas según se indica. Las secuencias nucleotídicas contenidas de TrkB-FL y TrkB-T1 corresponden con las específicas de rata (*Rattus norvegicus*, NP_036863 y NP_001156640 respectivamente). LV, lentivirus; HA, hemaglutinina; Nt, N-terminal; Ct, C-terminal.

1.2.1 Generación de lentivirus

La producción de los virus recombinantes se realizó siguiendo el procedimiento descrito previamente (Lois et al., 2002) con algunas modificaciones. Brevemente, se realizó una triple transfección en células HEK293T con el vector lentiviral y los plásmidos de empaquetamiento pCAG-VSVg (Matsuura et al., 2001) y pCMVΔR8.91 (Zufferey et al., 1997), utilizando Lipofectamina 2000 según las instrucciones del fabricante. Transcurridas 4 h, se sustituyó el medio de transfección por *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM, ref. 31980-022, Life technologies) suplementado con 10% FBS, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml), que se mantuvo durante 48 h. Los sobrenadantes, conteniendo las partículas virales, fueron recogidos y filtrados mediante el uso de unidades de filtración Steriflip-HV (Merck Millipore) con poro de 0.45 µm. A continuación,

los virus fueron concentrados por ultracentrifugación en un rotor basculante SW28 (Beckman Coulter) a 20000 rpm durante 2 h a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, el virus sedimentado fue resuspendido en tampón fosfato salino 0.1 M (PBS; NaCl 136 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, pH 7.4) durante una noche a 4°C, tras lo cual, se prepararon alícuotas que se conservaron a -80°C.

1.2.2 Titulación de las suspensiones lentivirales

1.2.2.1 Titulación mediante FACScan

La titulación de todos aquellos lentivirus que expresan proteínas fluorescentes se realizó siguiendo el protocolo de (Barde et al., 2010) con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizó la línea celular PC12 ya que en ella se expresa el gen de sinapsina (Thiel et al., 1991) y, por tanto, también los transgenes presentes en los vectores lentivirales bajo el control de su promotor. Sesenta mil células fueron sembradas en cada pocillo de una placa M-24. Transcurridas 24 h, se determinó el número exacto de células por pocillo, y éstas fueron infectadas con diluciones seriadas de la suspensión viral concentrada. El porcentaje de células que expresaban GFP se determinó 72 h después de la infección mediante análisis por citometría de flujo con FACScan (B-9320, BD Biosciences). A continuación, se procedió al cálculo del título lentiviral expresado en unidades de transducción (UTs) para un volumen determinado de suspensión viral según la fórmula: $P \times N/100 \times V$, donde P es el porcentaje de células verdes, N el número de células presentes en el momento de la transducción, y V el volumen de virus utilizado. Para realizar este cálculo, se escogieron los datos de la dilución de virus que presentaba un porcentaje de infección dentro del rango lineal (5-20%). En base a estos cálculos se estableció la multiplicidad de infección (m.o.i.) de cada experimento (expresada como UT/célula), siendo 1 UT/célula o m.o.i.=1 el volumen de suspensión viral necesario para transducir el 100% de las células de un cultivo.

1.2.2.2 Titulación mediante RT-PCR cuantitativa

Para la titulación de los lentivirus que no expresan ninguna proteína fluorescente, se realizó una determinación del título estructural mediante la cuantificación del ARN viral presente en las suspensiones concentradas (Lizee et al., 2003). Para ello, se extrajo el ARN viral procedente de alícuotas de 5 µl de suspensión con el kit *RNeasy micro* (Qiagen), añadiéndose un paso de tratamiento con desoxirribonucleasa I (DNase I) para eliminar cualquier traza de ADN contaminante. A continuación, se partió de un volumen fijo de las muestras de ARN para sintetizar el ADNc, utilizando como cebadores hexanucleótidos degenerados, y se procedió a su análisis mediante la técnica de PCR cuantitativa. Para ello, se utilizaron cebadores específicos diseñados contra la región de empaquetamiento del virus (5'-ACT TGA AAG CGA AAG GGA AAC y 5'-CAC CCA

TCT CTC TCC TTC TAG CC) y una sonda Taqman (5'-FAM- AGC TCT CTC GAC GCA GGA CTC GGC-MGB) (Life technologies), una modificación respecto de los descritos por (Sastry et al., 2002). Junto a las muestras problema, se analizaron también diluciones seriadas de un plásmido lentiviral de concentración conocida, que contenía la región de empaquetamiento. De este modo, se creó una recta patrón para poder determinar el número de copias de la región ampliificada presente en las suspensiones virales. Tras los cálculos pertinentes, teniendo en cuenta que cada partícula viral contiene 2 moléculas de ARN, se determinó el título estructural, expresado como el número de partículas virales contenido en un volumen determinado de suspensión viral.

1.2.3 *Infección de cultivos primarios con lentivirus*

Los cultivos primarios de neuronas corticales se infectaron en cada experimento con un número igual de partículas o de UTs/célula de los distintos virus empleados. Para ello, a los 7 DIVs se añadió al medio de crecimiento el volumen adecuado de suspensión viral concentrada, teniendo en cuenta el título obtenido. Los tratamientos con NMDA/glicina u otros reactivos, en caso necesario, se realizaron 6 días después de la infección.

1.3 Modelos animales de isquemia cerebral

1.3.1 *Modelo en ratón de isquemia cerebral permanente por fototrombosis*

En los experimentos iniciales, ratones macho CD-1 (35-45 g; Harlan Laboratories) de 8-12 semanas de edad fueron sometidos a isquemia cerebral permanente realizada mediante fototrombosis, según el método descrito previamente (Schroeter et al., 2002) con algunas variaciones. Este método consiste básicamente en la inducción fotoquímica de una trombosis y coagulación microvascular masiva en un área cerebral determinada por administración de un compuesto altamente fotosensible, como es el Rosa de Bengala, que induce daño endotelial y agregación plaquetaria tras su irradiación. Para ello, los animales fueron anestesiados mediante mascarilla facial con isoflurano 1% en oxígeno, colocados en un marco estereotáxico (Narishige), y su temperatura corporal mantenida a 37°C durante todo el procedimiento mediante una placa de calor. Tras una incisión medial del tejido pericraneal, el cráneo fue expuesto y los puntos anatómicos Bregma y Lambda identificados. El haz de fibra óptica de una fuente de luz fría (KL 1500 LCD, Schott), con una apertura de 1.9 mm de diámetro, se colocó directamente sobre el cráneo a 2 mm posterior y 3 mm lateralmente respecto de Bregma en el hemisferio derecho, centrándose sobre una marca realizada previamente utilizando un micromanipulador. El compuesto Rosa de Bengala (30 mg/kg, Sigma-Aldrich) disuelto en solución

salina fue inyectado intraperitonealmente (i.p.) y 5 min después se inició la irradiación (600 lms, 3000 K), que se prolongó por 20 min adicionales. Posteriormente, se suturó la incisión realizada y se permitió la recuperación de los animales. Adicionalmente, ratones *sham-operated* utilizados como control fueron tratados de igual manera aunque omitiendo la irradiación con la luz fría. En todos los experimentos, el área de tejido isquémico del hemisferio ipsilateral fue comparado con su región correspondiente del hemisferio contralateral, utilizada como control.

Posteriormente, y con objeto de optimizar la reproducibilidad del modelo, se realizaron algunas modificaciones sobre el mismo. Utilizamos ratones Balb/c (25-30 g; *Harlan Laboratories*) de igual edad ya que, al tratarse de una línea consanguínea, se obtienen infartos de volúmenes mucho más homogéneos (Sugimori et al., 2004), lo que facilitaría la posibles detección posterior de efectos neuroprotectores derivados del tratamiento con los péptidos diseñados. En estos animales, el proceso de isquemia cerebral se indujo como anteriormente pero aumentando el diámetro del haz de luz hasta 2.25 mm, lo que producía volúmenes de infarto mayores, y utilizando la vía intravenosa (i.v.) mediante inyección vía retro-orbital en el seno venoso para la administración del Rosa de Bengala, descrita anteriormente como una forma de obtener infartos más reproducibles (Dirnagl, 2010).

Cuando así se indica, los animales fueron divididos aleatoriamente en grupos experimentales a los que se administraron los diferentes péptidos Tat (10 mg/Kg disueltos en solución salina) o vehículo, 30 min después del inicio de la lesión por vía i.p., en los primeros experimentos, o previamente a la inducción del proceso de fototrombosis por vía retro-orbital en ensayos posteriores.

1.3.2 Modelo en rata de isquemia por oclusión transitoria de la ACM (MCAO)

Este modelo de isquemia cerebral en ratas Wistar fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. Joan Montaner (Hospital Universitario Vall d'Hebrón, Servicio de Neurología, Barcelona) que nos proporcionó las muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) para su análisis. Brevemente, este método consiste en la oclusión distal de la ACM (dMCAO) de manera temporal (90 min) seguido de la perfusión sanguínea durante 24 h, tal y como se ha detallado previamente (Morancho et al., 2012). Éste es un modelo altamente reproducible que produce infartos de tamaño considerable en regiones de la corteza cerebral que son territorio de la ACM.

1.4 Muestras humanas

Los sueros humanos analizados procedieron, de igual manera, del Hospital Universitario Vall d'Hebron, cuyo Comité Ético de Investigación Clínica aprobó su ce-

sión por parte del Dr. Montaner [proyecto de investigación PR(HG)89-2003] a nuestro laboratorio. Su uso fue también autorizado por el Subcomité de Bioética del CSIC.

De manera preliminar, analizamos el perfil temporal de un paciente que había sufrido un ictus y fue sometido a terapia trombolítica con tPA recombinante (rtPA), administrada hasta un máximo de 4.5 h después de la aparición de los primeros síntomas. Comparamos el suero obtenido al inicio del tratamiento, o condiciones basales, con el extraído 24 h después. Para este paciente existían datos clínicos relevantes como los resultantes del registro Doppler transcraneal, volumen de infarto a las 48 h obtenido mediante escaner por tomografía computarizada o valoración neurológica basal y a las 24 y 48 h mediante la escala de ictus de los NIH (*National Institutes of Health Stroke Scale*).

2. Procesamiento y análisis de muestras

2.1 Preparación de extractos proteicos

2.1.1 *Extractos proteicos procedentes de los cultivos celulares*

Los cultivos celulares se lavaron con PBS frío y posteriormente se prepararon extractos proteicos con el tampón de lisis RIPA [Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, deoxicolato sódico 1%, NP-40 1%, dodecil sulfato sódico (SDS) 0.1%, ditioneitol (DTT) 1 mM] suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (*Complete Protease Inhibitor Cocktail tablets* y *PhosSTOP Phosphatases Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) durante 30 min en hielo. A continuación, los extractos celulares se sometieron a sonicación por 30 s con el aparato Bioruptor (Diagenode), seguido de una centrifugación a 10000 rpm durante 20 min a 4°C para eliminar los restos celulares. La concentración proteica del sobrenadante se cuantificó mediante el reactivo BCA (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific) y cantidades iguales de proteína fueron desnaturalizadas en tampón de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, DTT 100 mM, SDS 2%, azul de bromofenol 0,005%, glicerol 10%) a 95°C por 5 min.

2.1.2 *Extractos proteicos procedentes de los medios de cultivo*

Para el análisis de las proteínas presentes en los medios de cultivo, se adicionó a los mismos tampón de carga desnaturalizante y se mantuvieron a 37°C durante 15 min. En aquellos casos en que los medios condicionados poseían suero, éstos fueron incubados previamente durante 1 h a 4°C con sefaroza azul (*Blue Sepharose 6 Fast Flow*, GE

Healthcare Life Science) para la eliminación de la albúmina y otras proteínas del suero como el interferón o factores de coagulación, entre otros (Travis and Pannell, 1973).

2.1.3 *Extractos proteicos procedentes de corteza cerebral de ratón*

Animales *sham-operated* o sometidos a isquemia cerebral por fototrombosis fueron sacrificados 2.5 o 24 h después del inicio del daño isquémico. A continuación, los cerebros fueron seccionados coronalmente en rodajas de 1 mm de grosor y teñidos en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC, Sigma-Aldrich) al 2% en PBS 0.1 M durante el tiempo mínimo necesario para visualizar los límites del área infartada. El tejido isquémico del hemisferio ipsilateral fue diseccionado junto con la región equivalente en el hemisferio contralateral. Para la obtención de los extractos proteicos, las muestras se homogeneizaron en tampón RIPA suplementado con SDS 1% y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa s. Tras 30 min de incubación a 4°C, los lisados se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min a esa misma temperatura. Los niveles de proteína total en estos sobrenadantes se determinaron con el reactivo BCA y cantidades equivalentes fueron desnaturizadas en tampón de carga a 95°C durante 5 min.

2.1.4 *Extractos proteicos procedentes de sueros sanguíneos*

Los sueros sanguíneos de ratón fueron obtenidos 24 h después del inicio del daño isquémico inducido por fototrombosis, utilizándose animales *sham-operated* como control. Con el fin de obtener el suero, las muestras sanguíneas fueron incubadas a 37°C durante 15 min y centrifugadas a 4000 rpm a 4°C por 15 min. Como se mencionó anteriormente, las muestras de suero de rata y humano fueron proporcionadas por el Dr. Montaner. En el primer caso corresponden a animales sacrificados a las 24 h de la inducción del proceso de isquemia/reperfusión.

Teniendo en cuenta que los sueros sanguíneos contienen una alta concentración de IgGs y albúmina que dificultan la detección de otras proteínas, realizamos un paso previo mediante cromatografía para tratar de eliminar el exceso de las proteínas mencionadas en los sueros. Para ello, cantidades equivalentes de proteína para los distintos sueros (2 mg) se incubaron con Proteína A-sefarosa al 2% (PAS, Sigma-Aldrich), proteína G-sefarosa al 2% (PGS, Life technologies) y sefarosa azul al 28% durante 1 h a 4°C en agitación. Tras una centrifugación de 3 min a 11000 rpm a 4°C, se recogió el sobrenadante al que se añadió tampón de carga, siendo seguidamente desnaturizado a 37°C durante 15 min.

2.2 Western blot (WB)

Cantidades equivalentes de proteína (25-50 μ g) fueron separadas electroforéticamente en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y posteriormente transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Protran* 0.45 μ m, Perkin Elmer). Estas membranas se incubaron 45 min en solución de bloqueo [leche desnatada en polvo al 5% preparada en tampón TBS-T (*Tris Buffered Saline-Tween*, Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 137 mM, Tween-20 0.5%)] a temperatura ambiente (T/A) y, después, con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, preparado en esta misma solución según se indica (**Tabla M4**). Tras tres lavados de 5 min con TBS-T, las membranas se expusieron 1 h a T/A con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa, diluido en la solución de bloqueo. La detección de esta actividad enzimática se realizó utilizando el reactivo de bioluminiscencia ECL (*Western Lightning Plus-ECL*, Perkin Elmer). Para la cuantificación densitométrica de las proteínas detectadas se empleó el programa de análisis ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) según el método descrito por Luke Miller (<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>).

2.3 Inmunoprecipitación

2.3.1 Inmunoprecipitación de proteínas presentes en los extractos celulares

Los extractos proteicos procedentes de cultivos celulares preparados como anteriormente, fueron incubados en agitación durante toda la noche a 4°C con PAS y el anticuerpo RhoGDI según se indica en la **Tabla M4**. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 30 s a 11000 rpm y, tras recoger el sobrenadante, se procedió al lavado de los inmunocomplejos seis veces con tampón RIPA. Finalmente, se procedió a la desnaturalización de los complejos en tampón de carga, fraccionamiento mediante SDS-PAGE e inmunodetección por WB. Cantidades equivalentes del lisado total y del correspondiente sobrenadante tras la inmunoprecipitación fueron analizadas igualmente en paralelo.

2.3.2 Inmunoprecipitación de proteínas presentes en los sueros sanguíneos

Con objeto de optimizar los resultados y reducir al máximo la co-elución de las cadenas de inmunoglobulinas junto con la proteína inmunoprecipitada, en los sueros sanguíneos se realizó un paso previo de inmovilización irreversible del anticuerpo mediante su entrecruzamiento con PAS. Brevemente, el anticuerpo fue incubado durante 16 h en agitación continua a 4°C con

Anticuerpo	Inmunógeno	Hospedador	Dilución			Casa comercial
			WB	IF	IP	
GluN2A	Región Ct GluN2A humana	Cabra (P)	1:250			Santa Cruz Biotech. (sc1468)
HA.11	YPYDVPDYA	Ratón (M)	1:1000			Covance (MMS-101P)
βIII-tubulina	aa 443-450 βIII-tubulina humana	Ratón (M)		1:2000		Chemicon (MAB1637)
Espectrina	Membranas eritrocitos pollo	Ratón (M)	1:15000			Chemicon (MAB1622)
NeuN	Núcleos purificados células ratón	Ratón (M)		1:100		US Biological (N2173-02)
NSE	Péptido sintético NSE humana	Conejo (P)	1:15000			Chemicon (AB951)
β-actina	Péptido DDIAALVIDNGSGK (región Nt β-actina)	Ratón (M)	1:5000			Sigma-Aldrich (A5441)
GFP	Proteína purificada	Ratón (M)	1:1000			Roche (11814460001)
panTrkB	aa 160-340 TrkB humano	Conejo (P)	1:500	1:100		Santa Cruz Biotech. (sc8316)
panTrkB2	aa 156-322 TrkB humano	Ratón (M)	1:500			BD Biosciences (610102)
TrkB-T1	Péptido FVLFHKIPLDG (región Ct TrkB-T1)	Conejo (P)	1:250			Santa Cruz Biotech. (sc119)
TrkB-FL Ct	Región Ct TrkB-FL humano	Conejo (P)	1:500	1:50	1.5 µg/mg prot.	Santa Cruz Biotech. (sc11)
TrkB-FL pY515	Fosfopéptido del aa Y490 de TrkA humano (reconoce TrkB/C)	Conejo (P)	1:500			Cell Signaling Tech. (9141)
TrkB-FL pY816	Fosfopéptido del aa Y817 de TrkB humano	Conejo (M)	1:5000			Abcam (ab81288)
CREB pS133	Fosfopéptido sintético del aa S133 de CREB	Conejo (P)	1:1000			Merck Millipore (06-519)
CREB	Región Nt CREB humano	Conejo (M)	1:1000			Cell Signaling Tech. (9197)
RhoGDIα	Región Nt RhoGDIα humano	Conejo (P)	1:1000		1.2 µg/mg prot.	Santa Cruz Biotech. (sc360)
p53	aa 1-393 p53 humano	Conejo (P)	1:500			Santa Cruz Biotech. (sc6243)
anti-Conejo HRP	IgG de Conejo	Cabra (P)	1:5000			Santa Cruz Biotech. (sc2004)
anti-Ratón HRP	IgG de Ratón	Cabra (P)	1:5000			Santa Cruz Biotech. (sc2005)
anti-Cabra HRP	IgG de Cabra	Burro (P)	1:5000			Santa Cruz Biotech. (sc2056)
anti-Conejo Alexa 488	IgG de Conejo	Cabra (P)		1:500		Molecular Probes (A-11034)
anti-Ratón Alexa 546	IgG de Ratón	Cabra (P)		1:500		Molecular Probes (A-11030)

Tabla M4. Anticuerpos utilizados en este trabajo. Se indican las proteínas reconocidas, el inmunógeno y la especie hospedadora en la que se desarrolló cada uno de los anticuerpos, así como la dilución utilizada en los experimentos. WB, Western Blot; IF, Inmunofluorescencia; IP, Inmunoprecipitación; Ct, C-terminal; Nt, N-terminal; (P), policlonal; (M), monoclonal.

PAS y, seguidamente, el anticuerpo unido a la matriz fue lavado dos veces con tampón L-T (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM) y dos veces con H_3BO_3 /NaOH 200 mM pH 9.0. A continuación, el anticuerpo unido a la PAS se incubó con el reactivo entrecruzante dimetilsuberimidato (DMSB, Sigma-Aldrich) a una concentración de 20 mM en H_3BO_3 /NaOH 200 mM pH 9.0 durante 1 h a T/A. La reacción se detuvo incubando la mezcla con Tris-HCl 1M pH 7.4 durante 30 min. Finalmente, se retiró el anticuerpo no unido covalentemente mediante lavados con el tampón *ImmunoPure Gentle Ag/Ab* (Thermo Scientific), seguido por lavados con tampón L-T suplementado con NaCl 150 mM, y lavados con tampón L-T.

Las muestras de suero de rata (2 mg), una vez eliminado el exceso de albúmina y otras proteínas como se ha indicado anteriormente, fueron incubadas en agitación continua durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo TrkB-FL Ct inmovilizado en PAS. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 30 s a 11000 rpm y, tras eliminar el sobrenadante, se procedió al lavado de los inmunocomplejos seis veces con PBS. Finalmente, se procedió a la desnaturalización de los complejos en tampón de carga a 37°C durante 15 min y su posterior análisis por WB.

2.4 Ensayo de la viabilidad neuronal

La viabilidad global en los cultivos primarios, como se mencionó anteriormente formados por neuronas corticales y otros tipos celulares, se estableció mediante el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio MTT [bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, Sigma-Aldrich] y la formación de cristales de formazán, consecuencia de la actividad mitocondrial de las células viables. El compuesto MTT (0.5 mg/ml) se añadió directamente al medio de los cultivos neuronales de 13 DIVs al finalizar el tiempo de tratamiento de los diferentes experimentos. Tras 2 h de incubación a 37°C, el medio fue sustituido por dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar las sales de formazán resultantes. Éstas fueron cuantificadas seguidamente mediante espectrometría, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y sustrayendo el valor de fondo obtenido a 630 nm. Para establecer la contribución relativa a los valores de viabilidad celular total de las células gliales, componente fundamental de estos cultivos mixtos junto a las neuronas, cultivos paralelos fueron tratados con NMDA 400 μM y glicina 10 μM durante 24 h, y analizados mediante el mismo ensayo. Estas condiciones consiguen la muerte neuronal casi en su totalidad, mientras que las poblaciones no neuronales no se ven afectadas. La sustracción de este valor de absorbancia de cada uno de los datos obtenidos permitió establecer la viabilidad neuronal específica en las distintas condiciones analizadas. En cada ensayo, todas las medidas de viabilidad fueron realizadas en triplicado.

2.5 Inmunocitoquímica

Los cultivos primarios se crecieron como se ha descrito anteriormente sobre cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina y L-laminina, aunque utilizando la mitad de densidad celular. Al finalizar el tiempo de tratamiento de las células en cada experimento, éstas se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M durante 30 min. Tras varios lavados en PBS para eliminar los restos de fijador, las células fueron bloqueadas y permeabilizadas en una solución de PBS con 1% albúmina sérica bovina (BSA) y 0.1% de Tritón X-100 por 30 min. A continuación, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos según se indica en la **Tabla M4** en la solución anterior. Posteriormente, tras varios lavados con PBS, las células fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos durante 2 h a T/A según se indica en la **Tabla M4**. Finalmente, los cristales con las células fijadas se incubaron por 10 min con DAPI (1:1000 en PBS, Life technologies) y se montaron con Prolong (Life technologies) sobre portaobjetos. Las imágenes mostradas se adquirieron con un microscopio confocal espectral Leica LSM710 (Zeiss) con un objetivo plan-apocromático de inmersión de 63 aumentos, obteniendo cada uno de los canales de forma separada. Las imágenes que se muestran son secciones individuales de 0.5-1 μm de grosor y fueron procesadas con los programas Zen2009 (Zeiss) e ImageJ.

2.6 Histología cerebral

2.6.1 *Tinción de Nissl*

Tras 24 h del inicio de la isquemia cerebral por fototrombosis, los ratones fueron anestesiados profundamente y sometidos a perfusión intracardiaca con solución salina seguida de paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M pH 7.4. A continuación, los cerebros fueron extraídos y fijados en la misma solución durante toda la noche a 4°C. Secciones coronales de 50 μm de grosor fueron obtenidas con un vibratomo (VT1000S, Leica). Inicialmente, se identificó el tejido infartado mediante el estudio de la citoarquitectura mediante tinción de Nissl. Para ello, secciones de tejido se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar al aire por 24 h. Las preparaciones se sumergieron entonces en una solución de violeta de cresilo 0.1% (p/v) en ácido acético glacial al 0.3% (v/v) durante 13 min. Posteriormente, tras eliminar el exceso de colorante mediante un lavado con agua, las preparaciones se deshidrataron progresivamente en concentraciones crecientes de etanol (70, 96 y 100%) durante 2 min cada una. Finalmente, las muestras se clarificaron con xileno y se preservaron colocando sobre ellas cubreobjetos impregnados con DPX (Sigma-Aldrich).

2.6.2 Inmunohistoquímica

Secciones adyacentes a las utilizadas para la tinción de Nissl fueron permeabilizadas y bloqueadas con una solución de PBS 0.1 M con Tritón X-100 0.5% y BSA 1% durante 1 h a T/A. A continuación, las secciones se incubaron con los anticuerpos primarios disueltos en la misma solución durante toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con fluoróforos, durante 2 h a T/A. Posteriormente, la tinción nuclear se obtuvo mediante la incubación durante 10 min con DAPI disuelto en PBS como anteriormente, y las secciones fueron montadas en Mowiol (Sigma-Aldrich) sobre portaobjetos gelatinizados. En paralelo, en algunas secciones utilizadas como control se omitió la incubación con los anticuerpos primarios, para confirmar así que los niveles de tinción inespecífica eran despreciables. Finalmente, las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal como anteriormente.

2.7 Evaluación del volumen del infarto

Los animales fueron sacrificados 24 h después del inicio de la lesión y, tras un breve paso de congelación a -20°C durante 10 min, los cerebros extraídos fueron cortados en secciones coronales de 1 mm de grosor utilizando una matriz acrílica (Stoelting). A continuación, las rodajas fueron incubadas en TTC al 2% en PBS 0.1 M durante 15 min a 37°C y posteriormente fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M. Las secciones fueron digitalizadas tanto por su cara rostral como caudal y el volumen del infarto fue determinado utilizando el programa ImageJ. Brevemente, tras la calibración de las imágenes, los hemisferios ipsilateral y contralateral, así como la zona del infarto, se delinearon para obtener sus respectivas áreas, a partir de las cuales se calcularon los volúmenes. Una vez corregido el efecto producido por el edema mediante la comparación de los valores obtenidos entre los hemisferios ipsilateral y contralateral, el volumen de infarto fue expresado como porcentaje respecto al hemisferio cerebral.

3. Análisis estadístico

Los resultados aparecen representados como los valores de la media y el error estándar de la media (s.e.m.) procedentes de al menos 3 experimentos independientes. El análisis estadístico de los resultados fue realizado según se indica en cada caso. En función del número de grupos, la normalidad de sus datos y la homogeneidad de sus varianzas se utilizaron la prueba *t* de Student desapareada, el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de la diferencia honestamente significativa de Tukey (HSD de Tukey) o la prueba de Kruskal-Wallis con análisis posterior por el test de U-Mann Whitney. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS 19 (IBM).

RESULTADOS

1. Caracterización de la regulación del receptor TrkB en un modelo celular de excitotoxicidad

Los niveles del receptor de neurotrofinas TrkB-FL disminuyen drásticamente en respuesta a la sobreactivación de los NMDARs durante los procesos de excitotoxicidad. Esta regulación se debe mayoritariamente a la activación en estas condiciones de la proteasa Ca^{2+} -dependiente calpaína y el procesamiento de TrkB-FL en regiones intracelulares próximas a la membrana plasmática. El resultado es un receptor truncado de tamaño muy similar a TrkB-T1 (95 kDa) y que, al igual que esta isoforma, podría actuar como un dominante negativo de la función de TrkB-FL (Vidaurre et al., 2012). Los experimentos que permitieron alcanzar las conclusiones anteriores fueron realizados utilizando un anticuerpo que reconoce secuencias N-terminal extracelulares, comunes a todas las isoformas del receptor (panTrkB). Con el fin de profundizar en este mecanismo de regulación, en este trabajo de Tesis decidimos analizar en detalle los fragmentos intracelulares de TrkB-FL producidos como consecuencia de este procesamiento, utilizando un anticuerpo diferente que reconoce las secuencias C-terminales únicas de esta isoforma (TrkB-FL Ct). Para ello, cultivos primarios de neuronas corticales de rata mantenidos durante 13 DIVs fueron incubados con dosis de NMDA (100 μM) y su co-agonista glicina (10 μM) capaces de sobreactivar los NMDARs e inducir el proceso de excitotoxicidad, condiciones a las que nos referiremos de ahora en adelante como “NMDA”. Estos tratamientos se realizaron por periodos de tiempo variables (0.5-6 h), y los cultivos tratados fueron comparados con células sin tratar (**Fig. R1A**). El análisis de TrkB-FL mediante *Western blot* (WB) con el anticuerpo TrkB-FL Ct reveló la disminución de la forma completa (FL) y la aparición y acumulación progresiva de fragmentos de menor tamaño molecular, con movilidades relativas aproximadamente de 42 (f42), 37 y 32 (f32) kDa. En concreto, por su abundancia relativa, cabe destacar la acumulación de este último que, a diferencia de los otros dos fragmentos de TrkB-FL, no precisa de exposiciones prolongadas de las autorradiografías para su detección. El efecto de la sobreactivación del NMDAR en la proteína TrkB-FL se producía de forma específica y no como consecuencia de la muerte neuronal, ya que los niveles de la proteína enolasa específica neuronal (NSE) no sufrían cambios significativos en todas las condiciones empleadas. Por otra parte, la aparición de fragmentos estables (BDPs, *breakdown products*) de la espectrina cerebral, que es un sustrato bien caracterizado de calpaína, puso en evidencia la activación y posterior acción proteolítica de esta enzima. Al mismo tiempo, tal como se describió anteriormente (Vidaurre et al., 2012), se observó un incremento en los niveles de la isoforma TrkB-T1 a lo largo del tratamiento con NMDA, consecuencia de la alteración inducida en la regulación transcripcional del gen *Ntrk2* que favorece la expresión de la isoforma truncada en detrimento de la completa. Con objeto de extraer conclusiones más precisas respecto a la cinética de procesamiento de TrkB-FL inducida por NMDA, cuantificamos los niveles de esta proteína así como los del fragmento C-terminal mayoritario f32 resultante de su procesamiento en tres experimentos independientes. Los resultados fueron normalizados respecto a los niveles obtenidos para la proteína NSE en esas mismas muestras y representados como valores relativos (**Fig. R1B**). La reducción de los

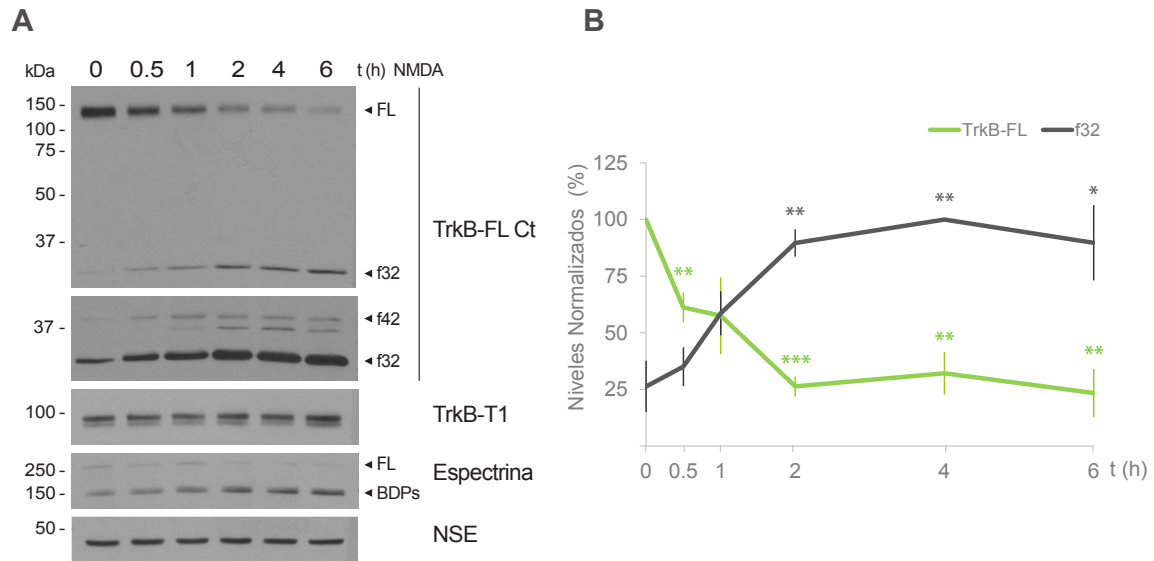


Figura R1. Regulación de TrkB inducida por excitotoxicidad en cultivos primarios de neuronas corticales. **A**, Análisis por WB del efecto temporal del tratamiento con NMDA (100 μ M) y su coagonista glicina (10 μ M) sobre los niveles de TrkB-FL, TrkB-T1, espectrina y NSE en cultivos primarios de 13 DIVs. La detección del receptor de neurotrofinas TrkB-FL se realizó mediante un anticuerpo que reconoce su región C-terminal, que permite distinguir la proteína completa (FL) y los fragmentos intracelulares que se generan en condiciones excitotóxicas de 32 (f32) y 42 kDa (f42) (panel superior y sobreexposición de la mitad inferior de esta membrana, mostrada en el siguiente panel). Igualmente, se indica la proteína correspondiente a la espectrina cerebral completa (FL) y sus productos derivados del procesamiento de calpaína de 145 y 150 kDa (BDPs). **B**, Cinética de la regulación de los niveles del receptor completo TrkB-FL (verde) y f32 (gris) mediante determinación densitométrica de sus bandas correspondientes normalizadas respecto los niveles de la proteína NSE. Los resultados aparecen representados como porcentaje en relación al valor máximo obtenido, al que se asignó arbitrariamente como 100%, que correspondió con los cultivos sin estimular para TrkB-FL y 4 h de tratamiento en el caso de f32. Los valores representados son las medias \pm s.e.m. de tres experimentos independientes y el análisis estadístico se realizó mediante el test de la *t* de Student despareada (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

niveles del receptor TrkB-FL se hizo patente tras sólo 30 min de tratamiento, alcanzando valores del $61 \pm 7\%$ ($p < 0.01$) respecto a las células sin tratar, a las que arbitrariamente se asignó un valor del 100%, y siguieron disminuyendo hasta el $13 \pm 11\%$ ($p < 0.01$) a las 6 h. En el caso de f32, los valores normalizados fueron expresados como porcentajes relativos respecto del nivel máximo detectado a lo largo de la estimulación (correspondiente al tiempo de tratamiento con NMDA de 4 h), al que arbitrariamente adjudicamos un valor del 100%. Transcurridas 2 h de incubación con NMDA, los niveles de este fragmento se incrementaron de manera significativa ($p < 0.01$) respecto las condiciones basales, en las que ya se detecta ligeramente su presencia ($26 \pm 11\%$). Su acumulación progresiva a lo largo del tratamiento, disminuyendo únicamente a tiempos prolongados, revela una alta estabilidad relativa de f32 en las condiciones excitotóxicas.

A continuación, analizamos mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal con el anticuerpo TrkB-FL Ct la distribución de esta isoforma en las neuronas y los cambios ocasiona-

dos en condiciones de excitotoxicidad. En condiciones basales, los cultivos mostraron un patrón de TrkB-FL extendido por prácticamente la totalidad de la neurona (**Fig. R2a**), distribución similar a la anteriormente observada con el anticuerpo panTrkB (**Fig. R2e**). La estimulación de los cultivos con NMDA durante 2 h indujo una reducción en la señal específica de la isoforma TrkB-FL (**Fig. R2b**), que era especialmente patente en el entramado dendrítico (**Fig. R2a2 y b2**). Mientras tanto, en los somas de las neuronas se mantenían niveles similares de tinción si bien su distribución era muy diferente (**Fig. R2a1 y b1**), observándose una disminución notable en la

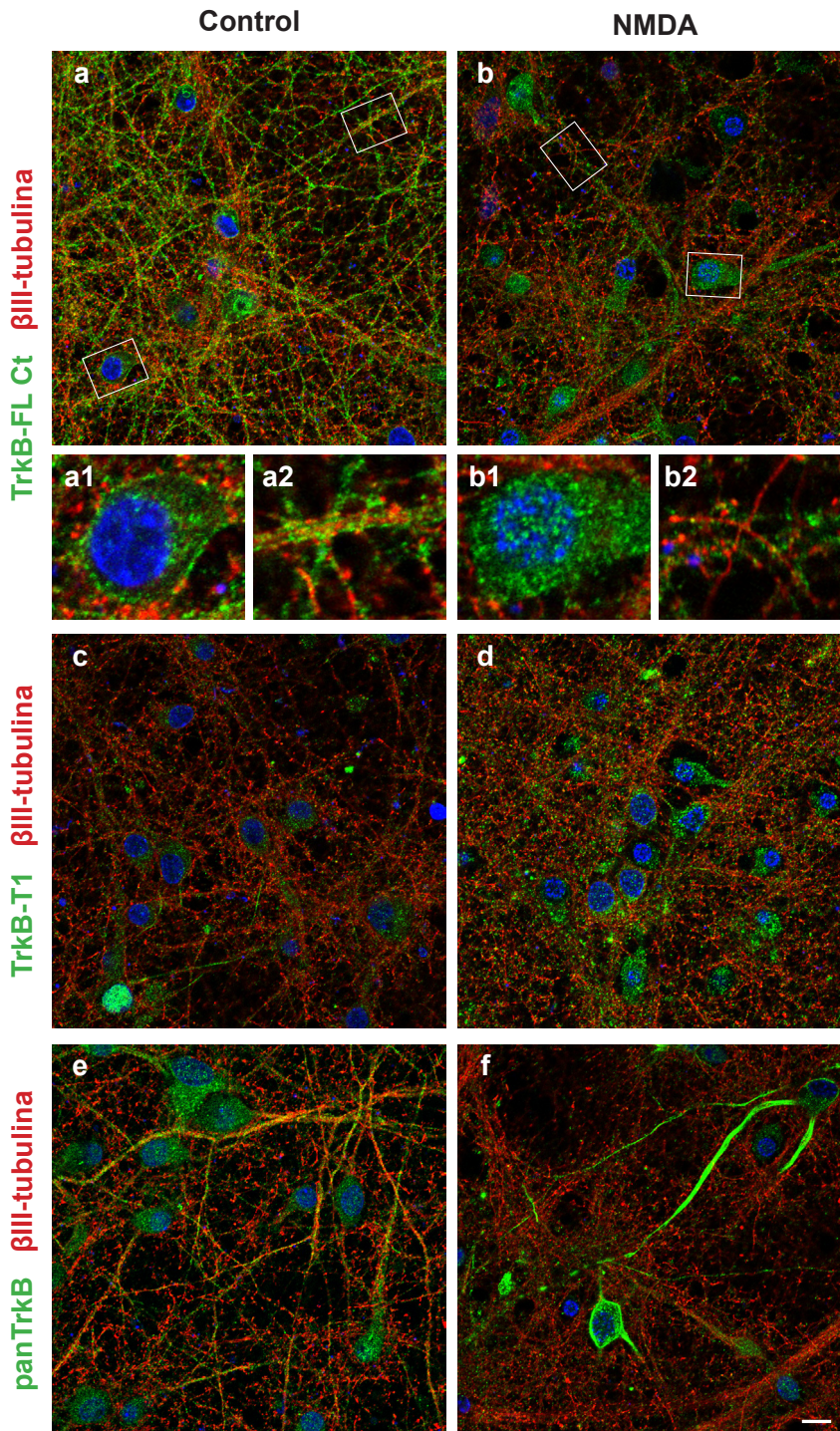


Figura R2. Efecto de la excitotoxicidad sobre la distribución y expresión de TrkB en cultivos corticales. Análisis mediante inmunofluorescencia en cultivos de 13 DIVs sin tratar (paneles izquierdos) o estimulados con NMDA durante 2 h (paneles derechos) de las isoformas de TrkB (en verde) detectadas con los anticuerpos específicos TrkB-FL Ct (**a-b**), TrkB-T1 (**c, d**) y panTrkB (**e, f**) que reconoce la región extracelular, idéntica para ambos receptores. Conjuntamente, se realizó el marcaje con el anticuerpo específico neuronal β -III-tubulina (en rojo) y el agente intercalante DAPI (en azul) que permite visualizar los núcleos. Las imágenes son secciones individuales obtenidas mediante microscopía confocal en las que se muestran los tres canales fusionados. Barra de escala: 10 μ m. Los paneles **a1**, **a2**, **b1** y **b2** son ampliaciones representativas del soma y dendritas neuronales de las imágenes en su parte superior.

señal presente en la membrana como consecuencia del tratamiento con NMDA, posiblemente debida a la formación de los fragmentos intracelulares previamente descritos. A diferencia de los cultivos sin tratar, el patrón detectado con panTrkB tras la sobreactivación de los NMDARs (**Fig. R2f**) fue notablemente diferente al observado previamente con el anticuerpo específico de la isoforma TrkB-FL, produciéndose una condensación de la señal en regiones próximas a la membrana plasmática y la aparición de dilataciones y varicosidades en las proyecciones neuronales, alteraciones de la morfología celular características de la excitotoxicidad (Park et al., 1996). El patrón detectado podría deberse a la contribución del receptor truncado de 95 kDa resultante del procesamiento de TrkB-FL, que permanece en la membrana plasmática pero podría desplazarse dentro de la misma, o a la isoforma TrkB-T1, cuyos niveles incrementan en las condiciones excitotóxicas (**Fig. R1A**; Vidaurre et al., 2012). Para confirmar esta última posibilidad, realizamos también experimentos de inmunofluorescencia con el anticuerpo de TrkB-T1 que reconoce la región específica de esta isoforma, observando un aumento notable en sus niveles tras el daño excitotóxico (**Fig. R2c y d**). La co-tinción en todos los experimentos anteriores con un anticuerpo específico para la proteína neuronal β III-tubulina no mostró diferencias importantes en sus niveles entre las células control y las tratadas, tan sólo una cierta redistribución parcial como consecuencia de las alteraciones morfológicas propias del proceso de excitotoxicidad.

En conjunto, los datos mostrados corroboran el procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad *in vitro* y demuestran la aparición y acumulación de fragmentos intracelulares estables del receptor resultantes de esta regulación.

2. Caracterización de la regulación del receptor TrkB en un modelo de isquemia cerebral focal permanente

La regulación de TrkB también ocurre en patologías donde el proceso de excitotoxicidad tiene lugar *in vivo*, conclusión a la que contribuyó nuestro laboratorio mediante experimentos de inmunohistoquímica realizados en un modelo experimental en rata de isquemia cerebral focal transitoria, inducida por oclusión temporal de la ACM, y necropsias humanas (Vidaurre et al., 2012). Con el fin de profundizar en la regulación de TrkB en isquemia, en este trabajo hemos utilizado un modelo en ratón de isquemia cerebral focal por fototrombosis (Schroeter et al., 2002) que, tratándose de un modelo reproducible y relativamente sencillo, permitirá el análisis futuro de la eficacia neuroprotectora de las herramientas que se desarrollen en esta Tesis. En este modelo se induce una lesión cortical mediante la administración sistémica de un compuesto fotosensible (rosa de Bengala) y la posterior irradiación focal de la zona cerebral elegida a través del cráneo. Por tanto, junto a las ventajas de su reproducibilidad y sencillez, este modelo es también muy poco invasivo, ya que no requiere craneotomía, y permite elegir de manera muy precisa mediante esterotaxia la localización de la región cortical a lesionar, así como modular la intensidad del daño (revisado en Braeuninger and Kleinschnitz, 2009). En este modelo, el desarrollo de la lesión ce-

rebral implica daño del endotelio vascular, activación plaquetaria y la subsecuente oclusión trombótica microvascular en la región irradiada (Watson et al., 1985). Por tanto, el modelo de isquemia por fototrombosis es relevante para el estudio de la isquemia humana, frecuentemente debida a la oclusión trombótica o embólica de pequeñas arterias, y da lugar a patrones histológicos muy similares a los encontrados de manera natural en los infartos humanos (Pevsner et al., 2001).

En este trabajo, hemos generado infartos dentro del territorio de la ACM derecha que afectan a zonas somatosensoriales de la corteza cerebral, fácilmente detectables mediante la tinción con colorantes vitales como el TTC. Así, en secciones coronales de cerebro obtenidas 24 h tras la inducción del daño se observa claramente la región infartada como una zona no teñida

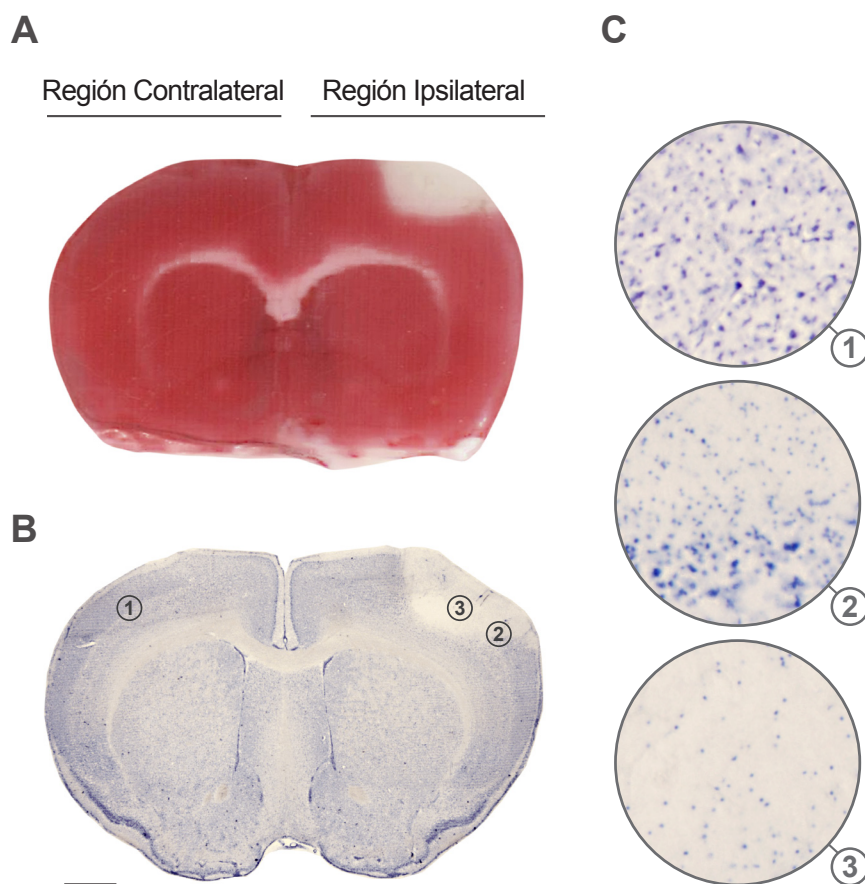


Figura R3. Caracterización del modelo murino de isquemia cerebral permanente por fototrombosis. **A**, Sección coronal (1 mm) de cerebro de ratón sometido al procedimiento de isquemia cerebral por fototrombosis y sacrificado tras 24 h teñida con el colorante vital TTC, que permite distinguir regiones metabólicamente activas (rojo) respecto de la zona de lesión en la corteza cerebral del hemisferio ipsilateral (blanquecina). **B**, Tinción de Nissl de una sección coronal (50 μm) de cerebro de ratón sometido al procedimiento anterior, donde se visualiza el tejido infartado como una zona hipocromática en el hemisferio ipsilateral en comparación con la región equivalente del hemisferio contralateral. Barra de escala 1 mm. **C**, Ampliación de regiones representativas de B donde se muestra en detalle la citoarquitectura de la región contralateral (1), la zona de transición entre la región lesionada y el tejido no isquémico (2) y la zona infartada (3).

en el cortex del hemisferio ipsilateral que contrasta con la región equivalente del hemisferio contralateral (**Fig. R3A**). Adicionalmente, corroboramos la formación del infarto mediante el colorante Nissl, utilizado como anteriormente en secciones coronales procedentes de animales sacrificados a las 24 h (**Fig. R3B**). Nuevamente, la zona de la lesión se distingue como un área hipocromática que en un análisis detallado muestra importantes cambios morfológicos en las células de la zona lesionada, reflejo del daño neuronal producido. Así, a diferencia de las células de las regiones no dañadas, que presentan el granulado basofílico típico de su citoplasma y núcleos con contorno oval o redondeado (**Fig. R3C-1**), en la zona infartada las células se caracterizan por una retracción y picnosis nuclear (**Fig. R3C-3**). Este contraste se hace especialmente patente en la zona de transición entre la región dañada y el tejido no isquémico (**Fig. R3C-2**).

A continuación, caracterizamos la cinética de la regulación de TrkB en este modelo de isquemia cerebral mediante experimentos de WB con extractos proteicos procedentes de animales sacrificados a dos tiempos diferentes tras la inducción del daño (2.5 y 24 h), comparando el tejido isquémico del hemisferio ipsilateral (I) con su región equivalente del hemisferio contralateral (C). De igual forma, analizamos extractos de animales *sham-operated* en los que se realizó el mismo procedimiento pero omitiendo la irradiación con la luz fría, por lo que no presentaron daño cerebral. El análisis con el anticuerpo panTrkB mostró una reducción en los niveles de TrkB-FL especialmente marcada a las 24 h de la inducción del daño isquémico (**Fig. R4A**). Por el contrario, los niveles de la proteína neuronal NSE no sufrieron cambios significativos en las regiones contralateral e ipsilateral de cada uno de los animales, confirmando que la disminución en los niveles de TrkB-FL es consecuencia del proceso isquémico y no de la muerte neuronal asociada al mismo. La cuantificación de los niveles relativos de TrkB-FL en tres animales por cada grupo, normalizados previamente respecto a la proteína NSE, indicaron un descenso estadísticamente significativo de esta isoforma en las regiones isquémicas, hasta alcanzar el $25 \pm 6\%$ ($p < 0.01$) respecto a sus regiones contralaterales equivalentes para el tiempo de 24 h (**Fig. R4B**). La activación temprana de la calpaína fue confirmada en este modelo mediante el análisis del procesamiento de la espectrina cerebral (**Fig. R4A**).

En el caso de la isoforma TrkB-T1, sus niveles también disminuyeron drásticamente en la región ipsilateral hasta el $48 \pm 6\%$ ($p < 0.05$) a las 24 h (**Fig. R4C**), a diferencia de lo observado previamente en el modelo celular de excitotoxicidad (**Fig. R1A**). Sin embargo, el análisis por inmunohistoquímica y microscopía confocal de esta misma isoforma en animales sometidos a lesiones de la misma duración mostró un claro incremento de la señal en la región isquémica respecto a su equivalente contralateral (**Fig. R4D**), de forma similar a lo anteriormente observado en el modelo de la oclusión de la ACM (Vidaurre et al., 2012). Estos datos, en principio contradictorios, podrían tener su explicación en la existencia de algún tipo de mecanismo adicional de regulación de TrkB-T1 en condiciones de excitotoxicidad, posiblemente procesamiento. En ese caso, podría originarse un polipéptido de pequeño tamaño molecular conteniendo el epítipo reconocido por el anticuerpo específico de esta isoforma, imposible

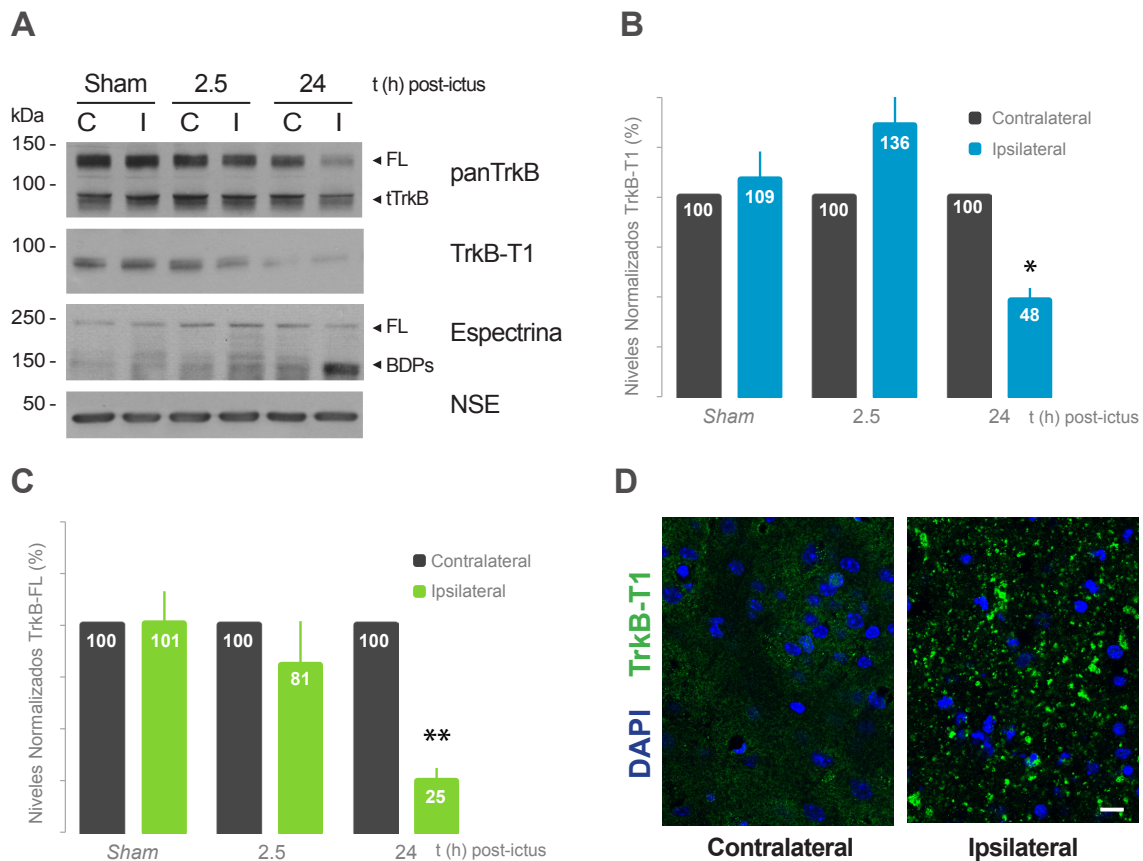


Figura R4. Regulación de TrkB en un modelo murino de isquemia cerebral permanente por fototrombolisis. **A**, Estudio por WB de los niveles de TrkB en extractos de cerebro de ratones obtenidos 2.5 o 24 h tras la inducción del daño isquémico, comparados con ratones *sham-operated*. Las muestras corresponden a regiones infartadas de la corteza cerebral ipsilateral (I) o áreas equivalentes en el hemisferio contralateral (C). Se utilizó el anticuerpo específico de la isoforma TrkB-T1, panTrkB, que reconoce la forma completa (FL) y las formas truncadas (tTrkB) de TrkB, así como los anticuerpos de espectrina y NSE. **B** y **C**, Cuantificación de los niveles de TrkB-FL y TrkB-T1, respectivamente, en animales sacrificados a distintos tiempos tras la inducción del daño cerebral (n=3). Los valores obtenidos por densitometría de las bandas correspondientes al hemisferio ipsilateral, normalizadas respecto a NSE, se representan como valores relativos respecto a los calculados en el hemisferio contralateral, al que se otorga un valor arbitrario del 100%. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **D**, Inmunohistoquímica de una sección coronal (50 μM) de cerebro de ratón sacrificado 24 h después de inducido el proceso de isquemia cerebral permanente, utilizando el anticuerpo de TrkB-T1 (verde) y DAPI (azul). La barra de escala representa 10 μm.

de detectar mediante estas condiciones de WB pero sí inmunohistoquímica. Dicho mecanismo, que operaría conjuntamente con la regulación transcripcional descrita anteriormente (Vidaurre et al., 2012), podría tener diferente peso específico en los modelos celular y animal de excitotoxicidad, lo que permitiría justificar las diferencias observadas (**Fig. R1A y R4A**).

En estos ratones también evaluamos el procesamiento de TrkB-FL mediante WB utilizando el anticuerpo que reconoce su región Ct, lo que nos permitió observar la presencia y acumulación *in vivo* del fragmento intracelular de 32 kDa en las regiones que sufrieron isquemia cerebral prolongada (**Fig. R5A**). De igual manera, en una línea consanguínea de ratón muy suscepti-

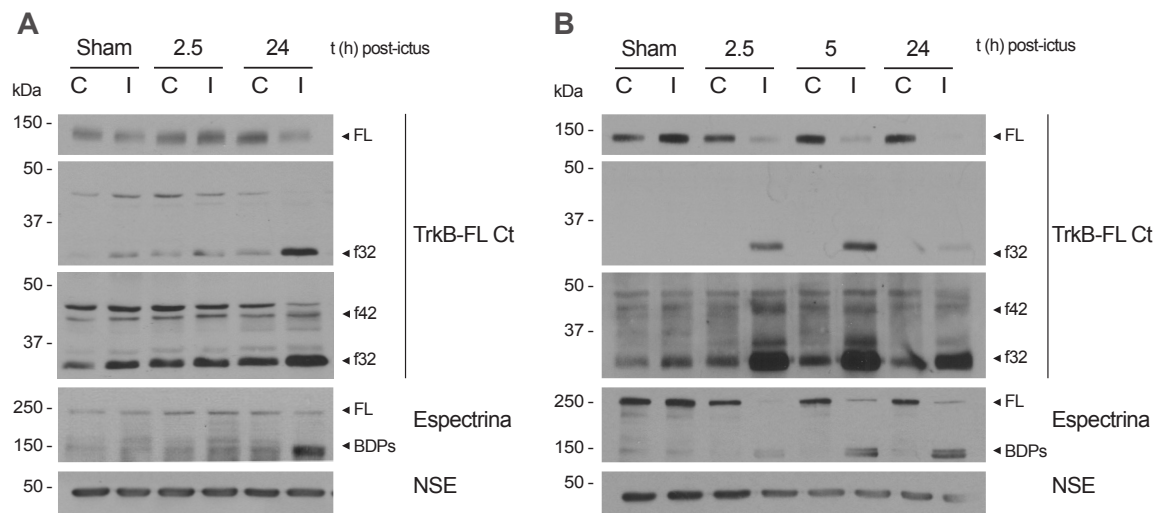


Figura R5. Análisis de los fragmentos de TrkB-FL producidos tras la inducción de isquemia cerebral permanente por fototrombosis. Estudio mediante WB de TrkB-FL y los fragmentos resultantes de su procesamiento, f42 y f32, así como espectrina y NSE, en extractos de cerebro de ratones sometidos a isquemia cerebral por fototrombosis y sacrificados a diferentes tiempos tras la lesión. El esquema experimental utilizado previamente (A) fue modificado para producir lesiones de mayor magnitud (B). En ambos casos se utilizaron animales *sham-operated* como control. I, región infartada; C, región contralateral.

ble al daño isquémico (Keum and Marchuk, 2009) en la que se generaron lesiones de mayor magnitud, observamos el fragmento de 32 kDa en el tejido dañado incluso en tiempos tan tempranos tras el inicio de la isquemia cerebral como son 2.5 h (**Fig. R5B**). Además, en estas condiciones también se detectaron otros fragmentos consecuencia del procesamiento de TrkB-FL con movilidades relativas de 35 y 42 kDa. Estos resultados son muy similares a los obtenidos previamente en el modelo de excitotoxicidad *in vitro* (**Fig. R1A**) e indican que la aparición de los fragmentos de TrkB-FL es un indicativo de la severidad del daño isquémico producido.

En conjunto, los experimentos anteriores demuestran el procesamiento de TrkB-FL en un modelo animal de isquemia por fototrombosis y la formación y acumulación en el tejido isquémico de fragmentos intracelulares relativamente estables. Adicionalmente, sugieren la existencia de un nuevo mecanismo de procesamiento para la isoforma TrkB-T1 que también contribuiría a la regulación de la vía BDNF/TrkB en isquemia cerebral.

3. Identificación de los fragmentos intracelulares de la isoforma TrkB-FL producto de la activación de calpaína en excitotoxicidad

Teniendo en cuenta que TrkB-FL es sustrato de calpaína (Vidaurre et al., 2012), quisimos averiguar cuáles de los fragmentos intracelulares que se producen en excitotoxicidad son resul-

tado de la acción de esta proteasa. Para ello, los cultivos primarios corticales fueron preincubados durante 1 h con los inhibidores específicos de calpaína, calpeptina (10 μ M), o el inhibidor III (CiIII, 10 μ M), así como con el inhibidor del proteasoma lactacistina (20 μ M). Tras ello, las células fueron sometidas a condiciones excitotóxicas mediante el tratamiento con NMDA durante 3 h y comparadas con los cultivos sin tratar (**Fig. R6**). El tratamiento con lactacistina logró impedir la degradación basal en los cultivos de p53, un sustrato bien caracterizado del proteasoma, aunque no fue capaz de prevenir la disminución de TrkB-FL inducida por NMDA ni la aparición de ninguno de sus fragmentos. De hecho, los niveles de éstos últimos aumentaron ligeramente respecto a los cultivos tratados con NMDA pero no lactacistina, lo que parece indicar que los fragmentos intracelulares de TrkB-FL sufren una leve degradación proteasómica una vez producidos. Como cabía esperar, los inhibidores de calpaína previnieron en gran medida el descenso de los niveles de TrkB-FL y también, de manera muy notoria, la aparición del fragmento mayoritario f32. Curiosamente, este hecho iba acompañado de una acumulación más marcada de f42. El análisis de los BDPs de la espectrina cerebral permitió comprobar la activación de calpaína mediada por el tratamiento con NMDA y su bloqueo en presencia de sus inhibidores específicos. Estos resultados verifican que calpaína es la responsable principal del procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad y que, como consecuencia del mismo, se genera un fragmento intracelular con una movilidad electroforética de unos 32 kDa. Este polipéptido es probablemente complementario del fragmento de 95 kDa que contiene las secuencias extracelulares del receptor, descrito con anterioridad (Vidaurre et al., 2012). Además, estos datos ponen de manifiesto la implicación de otras enzimas en la fragmentación de TrkB-FL inducida en excitotoxicidad, cuya acción daría lugar a un polipéptido de unos 42 kDa que parece contener las secuencias de procesamiento por calpaína y es, por tanto, susceptible de ser procesado por esta proteasa dando lugar a f32.

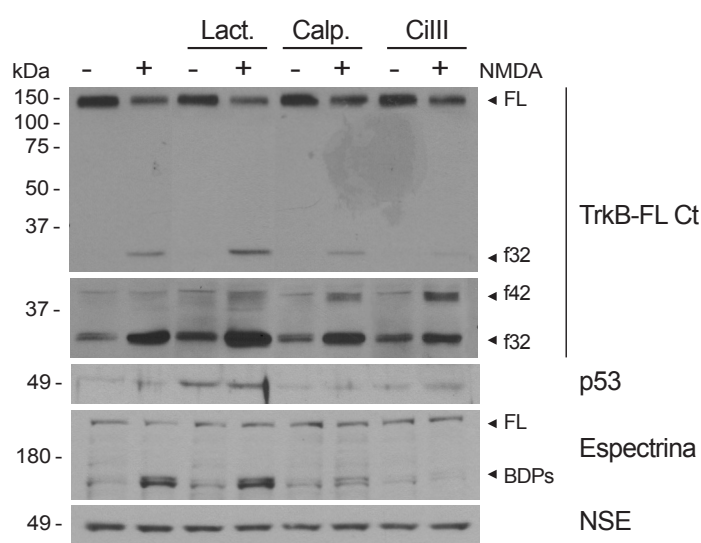


Figura R6. Identificación de los fragmentos intracelulares resultantes del procesamiento de TrkB-FL como producto de la acción de la calpaína. Cultivos celulares preincubados con el inhibidor del proteasoma lactacistina (Lact., 20 μ M) o los inhibidores de calpaína calpeptina (Calp, 10 μ M) o inhibidor III (CiIII, 10 μ M) durante 30 min fueron sometidos posteriormente a tratamiento con NMDA durante 3 h. Los extractos celulares se analizaron por WB para establecer los niveles de TrkB-FL y sus fragmentos f32 y f42, la proteína p53, espectrina y NSE.

4. Estrategias neuroprotectoras dirigidas a prevenir el procesamiento de TrkB-FL por calpaína inducido en condiciones de excitotoxicidad

El desajuste en los niveles de las isoformas del receptor de neurotrofinas TrkB que se produce en condiciones de excitotoxicidad es un factor importante que contribuye a la muerte neuronal (Vidaurre et al., 2012). Tal como muestran los resultados anteriores, la acción de calpaína sobre TrkB-FL en excitotoxicidad *in vitro* e *in vivo* ejerce un papel esencial en el desbalance entre las isoformas. Siendo TrkB-FL una proteína crucial para la supervivencia y función neuronales, su procesamiento y el consiguiente bloqueo de sus vías de señalización intracelulares afectarían muy negativamente al destino de las neuronas sometidas a un ambiente excitotóxico. Por tanto, la prevención de este procesamiento tendría gran potencial como estrategia de neuroprotección. Sin embargo, para ello es necesario diseñar herramientas capaces de interferir específicamente la acción de la calpaína sobre TrkB-FL, puesto que la inhibición genérica de esta actividad proteolítica afectaría a sus funciones fisiológicas en neuronas.

Un primer requerimiento para el desarrollo de herramientas neuroprotectoras con TrkB-FL como diana sería averiguar la secuencia del receptor donde se produce la proteólisis por calpaína. Sin embargo, esta proteasa no reconoce en sus sustratos secuencias aminoácidas altamente conservadas sino elementos estructurales de orden superior, con tendencia a procesar zonas de separación entre distintos dominios funcionales (Stabach et al., 1997, Tompa et al., 2004). Una dificultad añadida a este análisis predictivo es que TrkB-FL tiene una gran diferencia entre su movilidad electroforética (145 kDa) y la prevista en función de su secuencia aminoácida (92 kDa), fundamentalmente debido a que posee numerosos sitios de modificación post-traducciona por N-glicosilación en su región extracelular (Haniu et al., 1995) y por la fosforilación de diversos residuos intracelulares (Guiton et al., 1994, Middlemas et al., 1994) (**Fig. R7**). Teniendo en cuenta las dificultades anteriores y que el peso molecular teórico del polipéptido Y515-G821 del receptor TrkB-FL de rata es 35 kDa, sólo podíamos predecir que el procesamiento por calpaína ocurría en una región amplia próxima a este residuo de tirosina.

4.1 Herramientas destinadas a la interferencia proteolítica en secuencias en torno al aminoácido 649 de TrkB-FL

Con objeto de esclarecer la secuencia de procesamiento por calpaína en TrkB-FL, en un trabajo anterior de nuestro laboratorio se expresó una proteína de fusión HA-TrkB-FL-GFP, que contenía un epítipo de hemaglutinina (HA) y la proteína verde fluorescente (GFP) respectivamente en sus extremos N- y C-terminales. Tras su digestión *in vitro* con calpaína purificada, el fragmento C-terminal de esta proteína de fusión fue purificado mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para GFP. De esta forma, pudimos secuenciar mediante el método

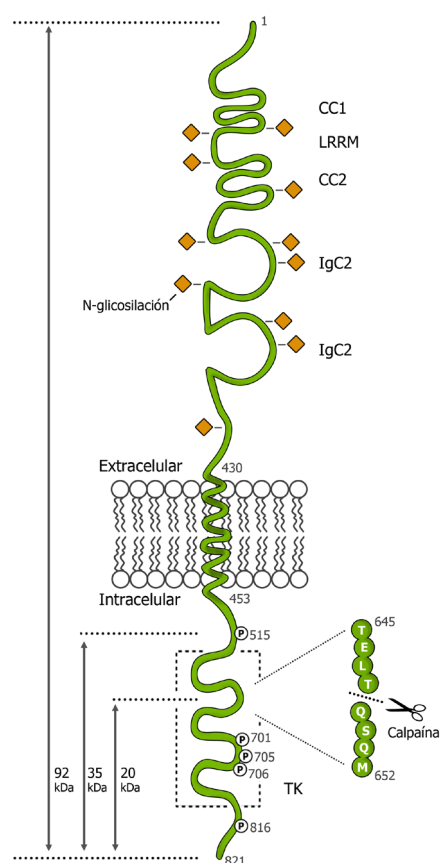


Figura R7. Representación de las modificaciones post-traduccionales principales de la proteína TrkB-FL y de la secuencia de procesamiento por calpaína inicialmente determinada por degradación de Edman. Se muestra un monómero de TrkB-FL indicando los principales dominios del receptor, los residuos N-glicosilados y los sitios de fosforilación más importantes. También se indica la secuencia de procesamiento por calpaína en TrkB-FL obtenida anteriormente en el laboratorio mediante secuenciación de Edman del fragmento Ct originado. El tamaño teórico de la proteína completa y de los fragmentos intracelulares Y515-G821 y Q649-G821 se señalan también en este esquema (flechas negras). CC1 y CC2, dominios ricos en cisteínas; LRRM, dominio rico en leucinas; IgC2, dominios de inmunoglobulina de tipo C2; TK, dominio tirosina quinasa.

de degradación de Edman los 6 primeros aminoácidos del extremo N-terminal de dicho fragmento, obteniendo como resultado la secuencia Q-S-Q-X-R-S, donde X podría corresponder a cualquier residuo (Vidaurre, 2011). Comparando esta secuencia con la de la proteína TrkB-FL de rata, observamos que la única coincidencia en al menos 3 residuos era la encontrada en la posición 649 (Q-S-Q-M-L-H), cuyo procesamiento daría lugar a un fragmento de un tamaño teórico de 20 kDa (**Fig. R7**). La discrepancia entre dicho tamaño y el calculado experimentalmente podría deberse a las modificaciones post-traduccionales previamente descritas para este polipéptido. Por consiguiente, para explorar el procesamiento de TrkB-FL como diana en neuroprotección, en una primera aproximación utilizamos dos estrategias diferentes para interferir el reconocimiento putativo por calpaína de las secuencias próximas al residuo 649 de esta isoforma.

4.1.1 Generación de un receptor *TrkB-FL* mutante mediante sustitución de la secuencia putativa de reconocimiento por calpaína

Nuestra primera aproximación consistió en tratar de generar un receptor TrkB-FL que tuviera mayor resistencia a la proteólisis por calpaína que la forma salvaje y evaluar su efecto sobre la supervivencia neuronal en condiciones de excitotoxicidad. Realizamos mutagénesis dirigida para obtener una forma mutante del receptor (HA-TrkB-FL-Mt) en la que sustituimos los 6 aminoácidos en posiciones -3/+3 de la secuencia identificada de procesamiento por calpaína (posicio-

nes 646 a 651) por otros residuos que, según la base de datos de sustratos de calpaína *Calpain Modulatory Proteolysis Database* (CaMPDB; duVerle et al., 2010), aparecen con muy baja frecuencia en dichas posiciones. Con el fin de estudiar el efecto de la expresión de HA-TrkB-FL-Mt en cultivos primarios neuronales, decidimos hacer uso de vectores lentivirales, ya que éstos son capaces de transducir células no proliferativas como las neuronas e integrar su genoma en el de la célula huésped sin apenas problemas de silenciamiento génico (Lois et al., 2002, Pfeifer et al., 2002). Para ello, elegimos un vector generado anteriormente en nuestro laboratorio (LV-HA-TrkB-FL-GFP) que expresa la proteína de fusión previamente descrita HA-TrkB-FL-GFP en la población neuronal de los cultivos mixtos, gracias al uso del promotor neuroespecífico del gen de la sinapsina I humana (Vidaurre, 2011). Utilizando este vector, sustituimos las secuencias codificantes para el receptor salvaje por las del mutante para obtener una construcción lentiviral que expresa la forma HA-TrkB-FL-Mt fusionada con la proteína GFP (LV-HA-TrkB-FL-Mt-GFP) (**Fig. R8A**).

Seguidamente, los cultivos primarios fueron transducidos a 7 DIVs con multiplicidades iguales de los lentivirus LV-HA-TrkB-FL-GFP y LV-HA-TrkB-FL-Mt-GFP (m.o.i. 1) y tratados a 13 DIVs con dosis excitotóxicas de NMDA durante periodos de tiempo variables (2-6 h) (**Fig. R8B**). El análisis mediante WB con un anticuerpo que detecta la proteína GFP permitió observar los receptores recombinantes con un tamaño aproximado de 170 kDa (FL), correspondiente a la suma de movilidades de TrkB-FL y GFP. Adicionalmente, en los cultivos infectados con LV-HA-TrkB-FL-GFP se detectó la disminución progresiva de una proteína con una movilidad relativa de unos 70 kDa (f1), presente en condiciones basales, al tiempo que otro fragmento de unos 60 kDa (f2) aparecía y se acumulaba en respuesta al daño excitotóxico. Por el contrario, las neuronas transducidas con el virus que expresa el receptor mutado no mostraban la proteína de 60 kDa y la de menor movilidad electroforética f1 se mantenía más estable. Una vez descontado el aporte que proporciona la proteína GFP en la movilidad relativa, las proteínas observadas podrían corresponder con los fragmentos intracelulares de 42 y 32 kDa descritos anteriormente para la proteína endógena en cultivos sin infectar (**Fig. R1A**). De este resultado puede deducirse que el receptor HA-TrkB-FL-Mt-GFP tiene una resistencia parcial al procesamiento por calpaína, que es específica y no ocurre para HA-TrkB-FL-GFP o el receptor endógeno detectado con panTrkB (**Fig. R8B**). No obstante, la cuantificación de los niveles de receptores recombinantes que permanecen sin procesar tras 2 h de tratamiento con NMDA, establecidos mediante un anticuerpo para HA y previamente normalizados respecto a los de NSE, solo mostró una tendencia a una mayor estabilidad de la forma mutada de HA-TrkB-FL-GFP frente a la salvaje, aunque estas diferencias no eran estadísticamente significativas (n=4) (**Fig. R8C**). En conjunto, estos datos indican que la sustitución de los residuos 646-651 en HA-TrkB-FL-Mt interfiere la aparición en condiciones de excitotoxicidad de un fragmento intracelular que podría corresponder con f32, aunque esta resistencia parcial no conlleva una mayor estabilidad del receptor, sugiriendo la posible existencia de sitios adicionales de procesamiento por calpaína u otras proteasas entre otras posibilidades.

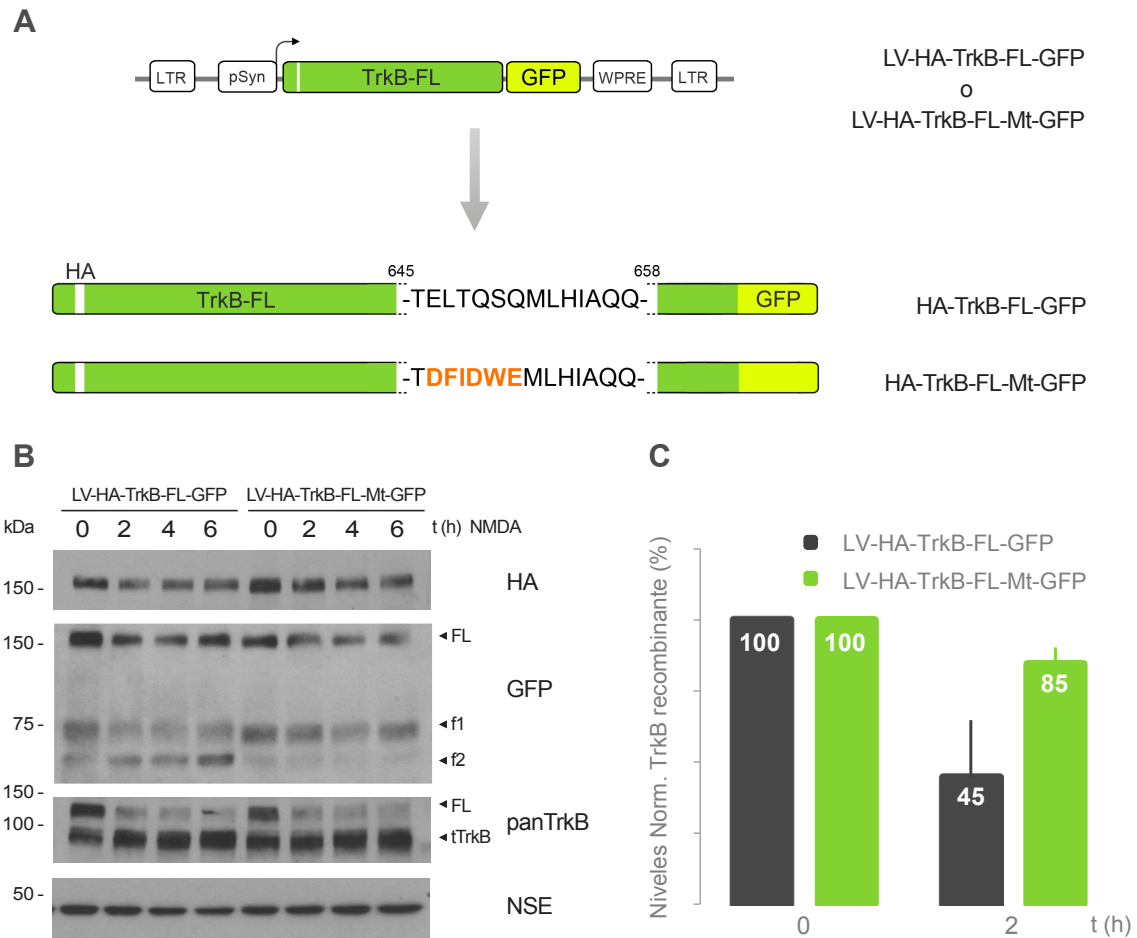


Figura R8. Generación y análisis de un mutante de TrkB-FL en una secuencia putativa de procesamiento por calpaína. **A**, Representación esquemática de los vectores lentivirales LV-HA-TrkB-FL-GFP y LV-HA-TrkB-FL-Mt-GFP utilizados para la expresión de las proteínas recombinantes de fusión TrkB-FL, salvaje o mutante, con GFP en su extremo C-terminal y una etiqueta HA N-terminal. En la forma mutante de TrkB-FL se realizó la sustitución indicada en la secuencia aminoacídica 646-651 (naranja). **B**, Cultivos primarios se infectaron a 7 DIVs de manera neuroespecífica con LV-HA-TrkB-FL-GFP o LV-HA-TrkB-FL-Mt-GFP (m.o.i. 1), y seis días después se incubaron con NMDA durante los tiempos indicados. Los niveles de los receptores exógenos se detectaron por WB con anticuerpos para HA y GFP, que reconoce también dos fragmentos designados como f1 y f2, mientras que el TrkB endógeno se analizó con panTrkB. **C**, Cuantificación por densitometría de los niveles de receptores recombinantes ($n=3$), detectados mediante el epítipo HA y normalizados respecto a NSE. A pesar de las diferencias observadas, éstas no fueron significativas según el análisis estadístico realizado aplicando el test de la t de Student desapareada.

A pesar de estos resultados no concluyentes, analizamos a continuación la capacidad neuroprotectora de la sobreexpresión de la proteína TrkB-FL mutante en comparación con la de TrkB-FL salvaje, en ambos casos combinada con la interferencia de la expresión de la isoforma TrkB-T1. Para ello, mutagenizamos como anteriormente el vector LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1 (**Fig. R9A**), un lentivirus dual que revierte de manera eficaz y neuroespecífica el desbalance de las isoformas de TrkB y tiene un efecto neuroprotector frente al proceso de excitotoxicidad (Vidaurre et al., 2012). La infección con este lentivirus es capaz de interferir en la misma célula la expresión

de TrkB-T1 mediante la acción de dos miARNs específicos (miT1) e incrementar simultáneamente los niveles del receptor TrkB-FL, previniendo parcialmente la muerte neuronal en condiciones de excitotoxicidad. Por tanto, era razonable pensar que el uso de esta misma estrategia pero expresando una forma mutante de TrkB-FL con mayor resistencia al procesamiento por calpaína podría mostrar efectos neuroprotectores mucho mayores a los descritos anteriormente. Para testar esta hipótesis, una vez generado dicho vector (LV-HA-TrkB-FL-Mt/2xmiT1) comparamos su efecto en la viabilidad neuronal con el de los lentivirus LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1 o LV-DsRed/GFP (**Fig. R9A**), un virus control que dirige la expresión neuroespecífica de las proteínas fluorescentes DsRed y GFP descrito previamente (Gascon et al., 2008a). Cultivos celulares a 13 DIVs fueron incubados con NMDA durante tiempos variables (2, 4 h), después de 6 días de la infección, y la viabilidad neuronal se analizó mediante el ensayo de la reducción de la sal de tetrazolio MTT (**Fig. R9B**). La viabilidad de los cultivos infectados con los distintos virus y no tratados con NMDA fue muy similar entre sí, indicando que la modificación de los niveles de TrkB-T1 junto con la sobreexpresión del receptor TrkB-FL salvaje o mutante no afecta a la supervivencia neuronal en las condiciones basales. Sin embargo, tras el estímulo excitotóxico la viabilidad de los cultivos infectados con el virus control LV-DsRed/GFP disminuyó al $58 \pm 5\%$ y $16 \pm 4\%$ a las 2 y 4 h respectivamente, mientras que en aquéllos transducidos con LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1, la supervivencia neuronal se mantuvo en valores del $85 \pm 1\%$ y $35 \pm 1\%$ para los mismos tiempos, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Contrariamente,

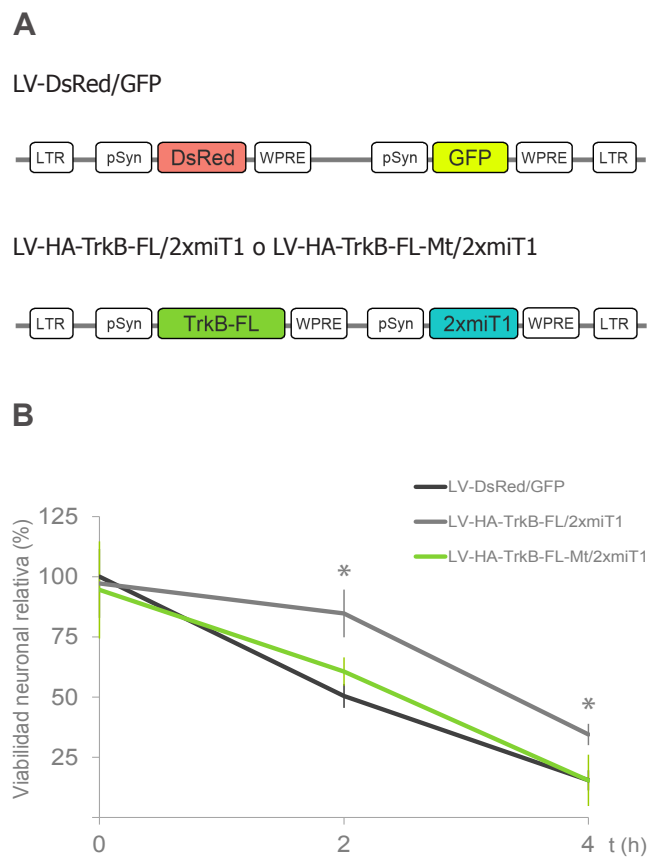


Figura R9. Efecto de la expresión del mutante de TrkB-FL simultáneamente con la interferencia de la expresión de TrkB-T1 sobre la viabilidad neuronal en excitotoxicidad. **A**, Esquema representativo de los vectores lentivirales LV-DsRed/GFP, LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1 y LV-HA-TrkB-FL-Mt/2xmiT1, que codifican respectivamente las proteínas fluorescentes DsRed y GFP, y el receptor HA-TrkB-FL, salvaje o mutante, conjuntamente con dos microARNs específicos para la isoforma TrkB-T1 (miT1). **B**, Análisis mediante ensayo con MTT de la viabilidad neuronal de cultivos primarios infectados con LV-DsRed/GFP, LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1 o LV-HA-TrkB-FL-Mt/2xmiT1 (m.o.i. 1), sometidos a diferentes tiempos de tratamiento con NMDA. Se descontó la contribución de las células gliales se realizó como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa valores relativos a los obtenidos en cultivos infectados con LV-DsRed/GFP mantenidos en condiciones basales. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U-Mann Whitney (* $p < 0,05$).

el efecto del tratamiento con NMDA en la supervivencia de los cultivos infectados con LV-HA-TrkB-FL-Mt/2xmiT1 fue muy similar al obtenido en aquéllos transducidos con el virus control.

La completa ausencia de efecto neuroprotector de este virus, ni siquiera equiparable al de LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1, nos llevó a estudiar las razones por las que se producían estos resultados. Por ello, seguidamente evaluamos si la forma mutante del receptor TrkB-FL era capaz de activarse de manera similar a la forma salvaje en respuesta a la unión de neurotrofinas, como su ligando BDNF. Para ello, en primer lugar infectamos los cultivos neuronales nuevamente con los lentivirus LV-HA-TrkB-FL-GFP y LV-HA-TrkB-FL-Mt-GFP, puesto que la fusión con GFP aumenta la movilidad electroforética de los receptores recombinantes (FL-GFP) y hace posible su discriminación respecto de los endógenos (FL) en los experimentos de WB (**Fig. R10A**). El tratamiento con BDNF (100 ng/ml) durante 2 h a los 13 DIVs activó eficientemente los receptores TrkB-FL endógenos, según se demuestra con un anticuerpo que detecta la fosforilación del residuo Y515, responsable del inicio de sus vías de señalización dependientes de MAPK/ERK y PI3K. En el caso del receptor recombinante HA-TrkB-FL-GFP, la fusión con GFP mantenía la capacidad de fosforilación en este residuo si bien el receptor presentaba una actividad elevada incluso en las condiciones basales, una consecuencia de su sobreexpresión tal como ha sido descrito previamente (Koponen et al., 2004). Por el contrario, HA-TrkB-FL-Mt-GFP no exhibía fosforilación alguna en el residuo Y515 ni siquiera en presencia de BDNF, que

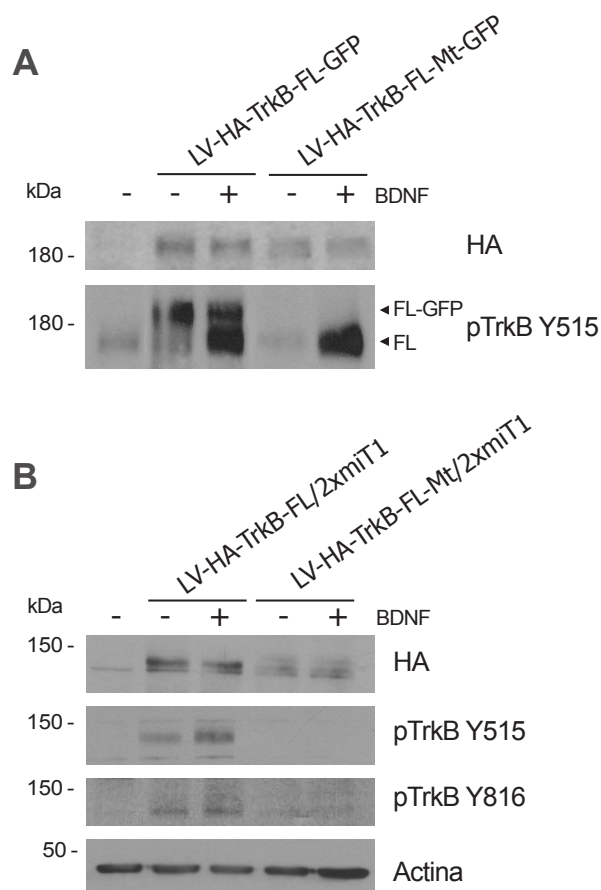


Figura R10. Análisis de la capacidad de activación del mutante de TrkB-FL en presencia de BDNF. **A**, Cultivos celulares infectados con los lentivirus LV-HA-TrkB-FL-GFP o LV-HA-TrkB-FL-Mt-GFP (m.o.i. 1) fueron incubados con BDNF (100 ng/ml) por 2 h. Se detectaron los receptores exógenos mediante WB con anti-HA y el nivel de fosforilación en el residuo Y515 de los receptores fusionados con GFP (FL-GFP) respecto la obtenida para los receptores endógenos (FL). **B**, Células HEK293T transfectadas transitoriamente con los plásmidos LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1, LV-HA-TrkB-FL-Mt/2xmiT1 o sin plásmido fueron tratadas con BDNF como anteriormente. Se comprobó la expresión de los receptores con anti-HA y la fosforilación de sus residuos Y515 y Y816. Los niveles de β -actina se utilizaron como control de carga.

sí era capaz de activar los receptores endógenos de estas mismas células. Sin embargo, esta falta de respuesta podría deberse únicamente a la mutación realizada, o bien, a un efecto conjunto de ésta con la fusión con GFP. Por esta razón, en una segunda aproximación decidimos utilizar la línea celular HEK293t, que no produce de forma natural este receptor de neurotrofinas, para expresar las formas salvaje y mutante de TrkB-FL sin fusionar con GFP. Para ello, transfectamos transitoriamente estas células con los plásmidos utilizados anteriormente para generar los lentivirus LV-HA-TrkB-FL/2xmiT1 y LV-HA-TrkB-FL-Mt/2xmiT1. Las proteínas codificadas en estos plásmidos pueden expresarse gracias a la presencia de un promotor CMV (*Cytomegalovirus*) fuera de la secuencia comprendida entre las regiones LTRs y que, por tanto, no se empaqueta en la cápside viral durante el proceso de generación de los lentivirus. Transcurridas 24 h desde la transfección, las células se trataron con BDNF (100 ng/ml) durante 2 h. En esta ocasión, tras comprobar la presencia de los receptores mediante su epítipo HA, pudimos observar que a diferencia de TrkB-FL, capaz de activarse tal y como muestran la fosforilación de sus residuos Y515 y Y816, este último responsable de la activación de la vía de la PLC γ , HA-TrkB-FL-Mt no mostró fosforilación en ninguna de las tirosinas indicadas incluso en presencia de BDNF (**Fig. R10B**).

En conclusión, los experimentos anteriores demuestran que las sustituciones realizadas en la secuencia ⁶⁴⁶ELTQSQ⁶⁵¹ de TrkB-FL suprimen completamente su actividad tirosina quinasa y, en consecuencia, impiden el inicio de sus vías de señalización, incluyendo las implicadas en la supervivencia neuronal. Esta pérdida de función podría ser debida a un cambio en la conformación tridimensional del dominio intracelular que afectase de alguna manera a su capacidad de fosforilación en los residuos Y515 y Y816. Por otra parte, el efecto de estas sustituciones sobre la estabilidad del receptor TrkB-FL en excitotoxicidad no ha quedado claramente establecido, aunque se observa una tendencia hacia la interferencia del procesamiento por calpaína, especialmente patente al prevenir la aparición de un fragmento intracelular que correspondería con f32. Esta resistencia parcial de HA-TrkB-FL-Mt-GFP al procesamiento podría ser una consecuencia de la supresión de su actividad tirosina quinasa, ya que la actividad de la calpaína sobre sus sustratos frecuentemente está modulada por el estado de fosforilación de éstos (Nicolas et al., 2002, Ma et al., 2012, Lopez-Menendez et al., 2013, Mihalikova et al., 2014). En cualquier caso, al tratarse de un receptor no activable, el mantenimiento de esta forma mutante de TrkB-FL no produciría un efecto neuroprotector incluso combinado con la interferencia de la expresión de TrkB-T1, de acuerdo con resultados anteriores que mostraron la necesidad de equilibrar simultáneamente el desbalance de las isoformas TrkB-FL y TrkB-T1 para mejorar la viabilidad de las neuronas en condiciones de excitotoxicidad (Vidaurre et al., 2012). Estos resultados señalan la necesidad de buscar estrategias alternativas para tratar de impedir el procesamiento por calpaína del receptor TrkB-FL sin afectar su función como tirosina quinasa.

4.1.2 *Diseño de un péptido con permeabilidad celular basado en la secuencia putativa de reconocimiento por calpaína en torno al aminoácido 649 de TrkB-FL*

Una estrategia que se ha mostrado eficaz en la interferencia específica del procesamiento por calpaína de algunos de sus sustratos es el uso de péptidos que contienen las secuencias putativas de reconocimiento por esta proteasa en el referido sustrato (Du et al., 2010, Hossain et al., 2013, Yin et al., 2013). La eficiencia de entrada al interior celular de estas secuencias de interés se facilita enormemente mediante su unión covalente a CPPs, pequeños péptidos generalmente de naturaleza básica capaces de atravesar la membrana plasmática y la BHE (Dietz and Bahr, 2004). Por tanto, este tipo de herramientas presentan un gran interés para su uso clínico en el tratamiento de patologías del SNC. Por otra parte, teniendo en cuenta que la secuencia de TrkB-FL previamente identificada como posible diana de calpaína también parece ejercer una importante función en la regulación de su actividad tirosina quinasa, una estrategia basada en el uso de este tipo de péptidos sería más segura para interferir el procesamiento de TrkB-FL sin alterar esta actividad. Generamos, entonces, un péptido que contenía los aminoácidos 639-652 de la secuencia TrkB-FL de rata (TFL₆₃₉) donde, según los resultados anteriores, se encontraría el sitio mayoritario de procesamiento por calpaína para esta proteína (**Fig. R11A**). Con el fin de facilitar su paso a través de la membrana plasmática y la BHE, esta secuencia se fusionó con el dominio de transducción de la proteína transactivadora Tat del VIH (aminoácidos 47-57), uno de los CPPs más utilizados en el SNC. Adicionalmente, se sintetizó un péptido de igual tamaño con la secuencia Tat unida a los aminoácidos 408-421 del factor de transcripción c-Myc (TMyc), que se utilizó como control negativo de forma similar a algunos trabajos previos (Tashev et al., 2009, Chiodi et al., 2014).

En primer lugar, quisimos verificar la permeabilidad a la membrana plasmática neuronal de estos péptidos. Para ello, cultivos de corteza cerebral de 13 DIVs fueron incubados durante 1 h con TMyc (15 μ M) marcado con el compuesto fluorescente FITC (**Fig. R11Bd-f**) y comparados con cultivos control sin tratar (**Fig. R11Ba-c**). Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal confirmaron la capacidad de estos péptidos de penetrar al interior de neuronas presentes en estos cultivos primarios, identificadas mediante inmunofluorescencia con un anticuerpo específico para esta subpoblación celular (NeuN) (**Fig. R11Be y f, flechas**), si bien también se observó la presencia de TMyc-FITC en otras células presentes en estos cultivos (**Fig. R11Be y f, cabeza de flecha**). A continuación, comprobamos la idoneidad de TMyc como péptido control en nuestro sistema celular evaluando su efecto sobre la viabilidad neuronal tanto en condiciones basales como en un ambiente excitotóxico. Para este fin, cultivos primarios de 13 DIVs fueron incubados con distintas concentraciones de TMyc (5, 15 o 25 μ M) durante 30 min seguidos por el tratamiento con los agonistas del NMDAR durante 4 h, o bien, mantenidos durante este periodo de tiempo en condiciones basales (**Fig. R11C**). La viabilidad neuronal, determinada mediante ensayos de MTT, mostró un comportamiento similar respecto a los cultivos que no fueron tratados con péptido para todas las concentra-

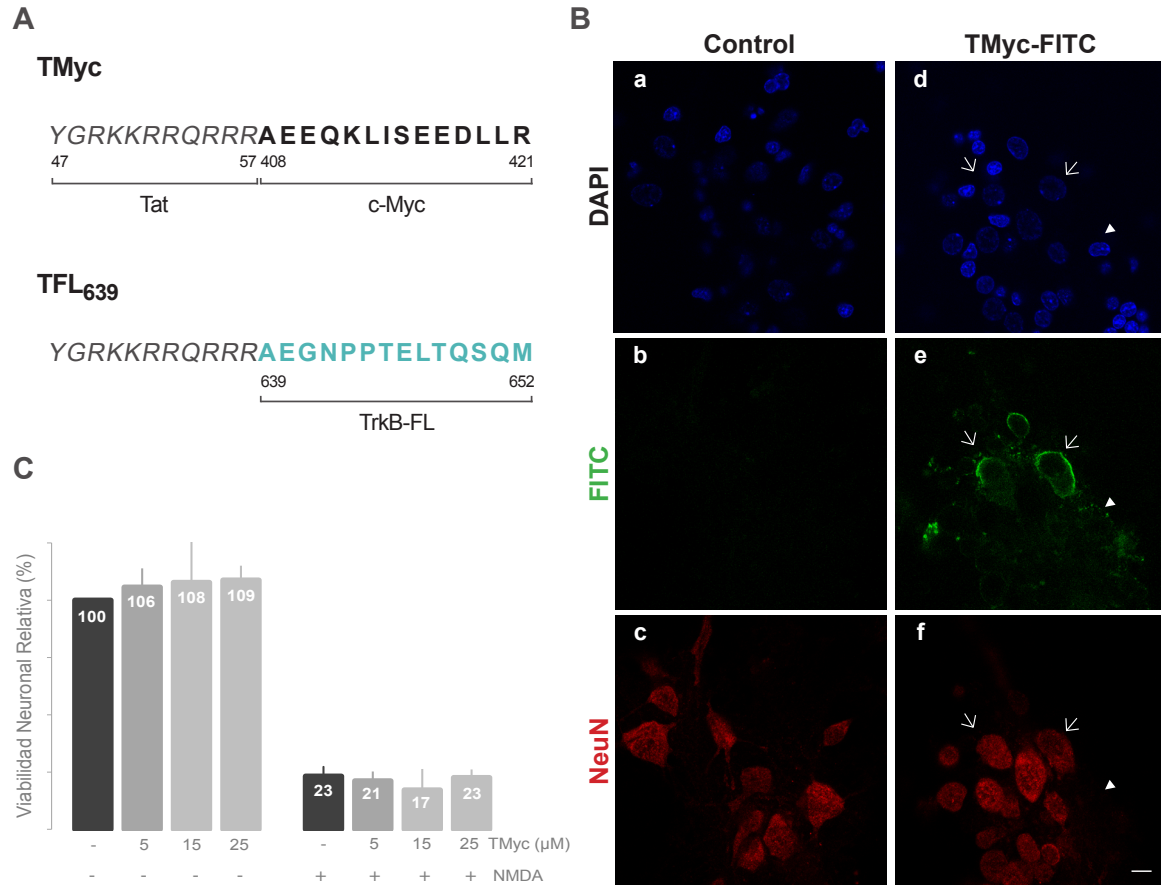


Figura R11. Esquema de los péptidos TMyC y TFL₆₃₉ desarrollados y caracterización del péptido control TMyC. **A**, Secuencia de los péptidos TMyC y TFL₆₃₉ en la que se indica el dominio de transactivación de la proteína Tat (cursiva), así como las secuencias de las proteínas Myc y TrkB-FL contenidas. **B**, Imágenes obtenidas por microscopía confocal de cultivos primarios incubados durante 1 h con TMyC (15 μM) marcado con FITC (d-f) y comparados con cultivos control que no recibieron el péptido (a-c). La permeabilidad de TMyc-FITC (verde) en neuronas (flechas) se analizó mediante inmunotinción con el anticuerpo que reconoce NeuN (rojo). También se indica la entrada del péptido TMyC en células no neuronales (cabeza de flecha). Barra de escala: 10 μM. **C**, Efecto del péptido TMyC sobre la supervivencia neuronal en cultivos celulares control o incubados con TMyC a las concentraciones indicadas durante 30 min, y posteriormente sometidos a NMDA o mantenidos en condiciones basales durante 4 h. El análisis mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U-Mann Whitney no mostró diferencias significativas entre los cultivos tratados con TMyC y aquéllos que no habían sido incubados con péptido (n=8).

ciones utilizadas, tanto en las condiciones control como en las de excitotoxicidad. En conjunto, estos resultados muestran que los péptidos Tat son permeables en neuronas corticales y no tienen efectos genéricos sobre su viabilidad en las condiciones experimentales utilizadas.

Una vez confirmadas las propiedades de péptidos Tat control, investigamos la capacidad de TFL₆₃₉ para prevenir el procesamiento por calpaína de TrkB-FL inducido por el NMDA y su repercusión en la viabilidad neuronal. En este caso, los cultivos fueron tratados con TMyC o TFL₆₃₉ (25 μM) durante 30 min previamente a su tratamiento con NMDA durante 2-6 h. El análisis mediante WB del curso temporal del procesamiento de TrkB mostró en ambos casos la reduc-

ción de los niveles de TrkB-FL, detectados tanto con panTrkB como TrkB-FL Ct, y el aumento progresivo de las formas truncadas (tTrkB) y del fragmento intracelular de 32 kDa (**Fig. R12A**). Los niveles de la isoforma completa establecidos con panTrkB en tres experimentos independientes, y normalizados con respecto a NSE, demostraron que el péptido TFL₆₃₉ no era capaz de prevenir la acción de calpaína y aumentar la estabilidad del receptor respecto al péptido control (**Fig. R12B**). De igual modo, la cinética de supervivencia neuronal a tiempos progresivos de excitotoxicidad fue muy similar en los cultivos pretratados con TFL₆₃₉ respecto a la obtenida con el péptido TMyC (**Fig. R12C**). En resumen, el péptido diseñado TFL₆₃₉ no altera la actividad de calpaína sobre TrkB-FL y, por tanto, no tiene efecto sobre la viabilidad neuronal en condiciones de excitotoxicidad. Estos resultados sugieren que la secuencia de TrkB-FL elegida podría no corresponder realmente con el sitio de procesamiento de calpaína, o bien que el péptido Tat diseñado TFL₆₃₉ carece de la conformación estructural necesaria para su reconocimiento por esta enzima.

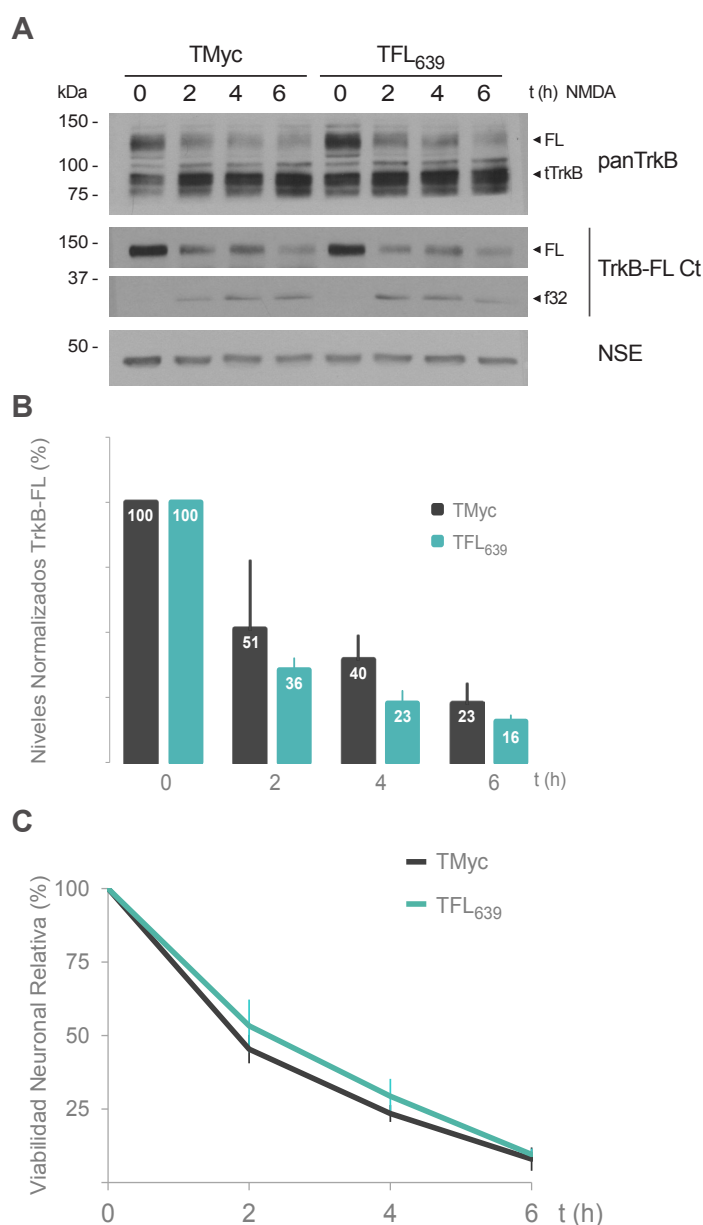
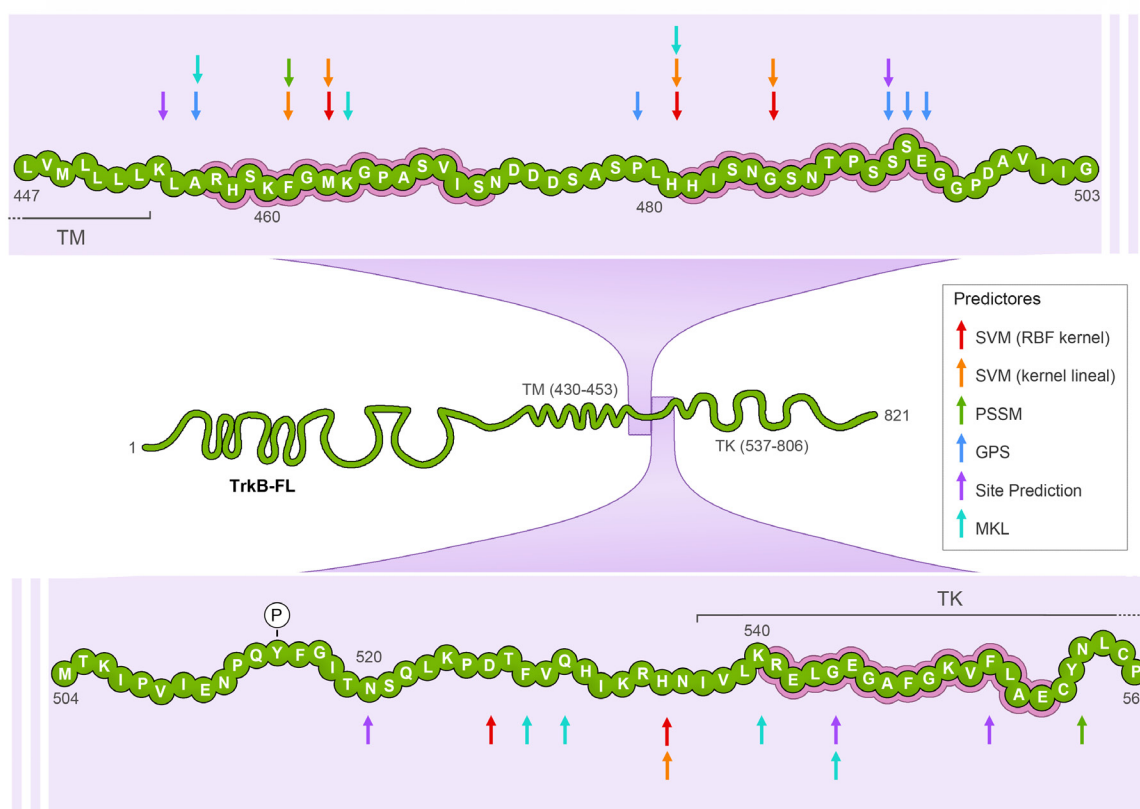


Figura R12. Estudio del efecto del péptido TFL₆₃₉ sobre la estabilidad de TrkB-FL y la muerte neuronal excitotóxica. **A**, Evaluación del procesamiento de TrkB-FL por WB en cultivos primarios de neuronas corticales fueron preincubados durante 30 min con los péptidos TMyC o TFL₆₃₉ (25 μ M) y tratados a continuación con NMDA durante los tiempos indicados. **B**, Cuantificación de la cinética de procesamiento de TrkB-FL detectado con panTrkB en presencia de TMyC o TFL₆₃₉. El promedio de los valores normalizados \pm s.e.m. (n=3) se representa como porcentaje respecto cultivos incubados con su respectivo péptido sin estimular con NMDA. **C**, Análisis de la supervivencia neuronal de cultivos incubados con TMyC o TFL₆₃₉ y tratados con NMDA de igual manera a lo indicado anteriormente (n=7). Los cálculos estadísticos mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U-Mann Whitney no mostraron diferencias significativas entre los cultivos tratados con TFL₆₃₉ y TMyC en ninguno de los casos.

4.2 Herramientas destinadas a la interferencia proteolítica en secuencias yuxtamembrana de TrkB-FL

El conjunto de los resultados obtenidos nos llevaron a explorar una segunda aproximación basada en la búsqueda *in silico* del sitio putativo de procesamiento por calpaína en TrkB-FL y el desarrollo de péptidos interferentes a partir de estas secuencias. Dado que la acción de calpaína da lugar a un receptor truncado TrkB-FL con una movilidad electroforética similar a la isoforma truncada TrkB-T1 (Vidaurre et al., 2012) y un fragmento intracelular de 32 kDa, estimamos

A



B

TFL₄₅₇

YGRKKRRQRR**RHSKFGMKGPASVIS**
457 471
TrkB-FL

TFL₄₈₂

YGRKKRRQRR**HISNGSNTPSSEEG**
482 495
TrkB-FL

TFL₅₄₁

YGRKKRRQRR**RELGEAGFGKVFLAE**
541 555
TrkB-FL

Figura R13. Predicciones *in silico* de dianas putativas de procesamiento por calpaína en la región yuxtamembrana de TrkB-FL y desarrollo de nuevos péptidos basados en ellas. **A**, Representación esquemática de la estructura de TrkB-FL y ampliación detallada de la secuencia de su región yuxtamembrana en la que aparecen indicados los sitios putativos para el procesamiento por calpaína, identificados mediante los programas de predicción *in silico* de CaMPDB, GPS-CDD y Site Prediction. TM, región transmembrana; TK, dominio tirosina quinasa. **B**, Estructura de los péptidos TFL₄₅₇, TFL₄₈₂ y TFL₅₄₁ desarrollados, basados en las zonas identificadas anteriormente (regiones resaltadas en **A**) donde se concentran varios de los resultados de mayor valor estadístico.

que la secuencia donde se producía la proteólisis debería encontrarse en los 100 aminoácidos intracelulares más próximos a su región transmembrana (aminoácidos 430-453 de la secuencia de rata; **Fig. R13A**), solapando con el inicio del dominio tirosina quinasa. Para el análisis *in silico* de esta región de TrkB-FL se utilizaron bases de datos en red, CaMPDB (duVerle et al., 2010) y SitePrediction (Verspurten et al., 2009), y la aplicación GPS-CDD (Liu et al., 2011). Estas herramientas utilizan diferentes algoritmos de predicción, basados en el análisis de secuencias empíricas de procesamiento por calpaína identificadas en sus sustratos: SVM (*support vector machine*) con kernel lineal o con kernel RBF (*radial basis function*), PSSM (*position-specific scoring matrix*), MKL (*multiple kernel learning*) (duVerle et al., 2010) y GPS (*group-based prediction system*) (Xue et al., 2008)B. Varios de los resultados predictivos de mayor valor estadístico se concentraban en torno a los aminoácidos 454-464, 481-494 y 535-544 de TrkB-FL, lo que sugería que entre estas secuencias podría encontrarse la diana de procesamiento por calpaína (**Fig. R13A**).

Aprovechando la misma estrategia anterior, desarrollamos péptidos Tat que contenían estas posibles secuencias de procesamiento por calpaína en TrkB-FL. De esta manera, los péptidos diseñados comprendían los aminoácidos 457-471 (TFL₄₅₇), 482-495 (TFL₄₈₂) y 541-555 (TFL₅₄₁) de la secuencia en rata del receptor unidos al dominio de la proteína Tat responsable de la transducción (**Fig. R13B, itálica**). Cabe destacar que los 9 primeros aminoácidos de TrkB-FL contenidos en el péptido TFL₄₅₇ son comunes a todas las isoformas de TrkB (**Fig. R13B, negrita**), mientras que los 5 residuos C-terminales son exclusivos de la isoforma completa. Seguidamente se analizó el efecto interferente de los péptidos TFL generados, junto al anteriormente descrito TFL₆₃₉ (**Fig. R11A**), sobre el procesamiento de TrkB-FL en condiciones de excitotoxicidad. Para este fin, cultivos primarios de 13 DIVs fueron incubados con los péptidos TMyC, TFL₄₅₇, TFL₄₈₂, TFL₅₄₁ o TFL₆₃₉ (25 μ M) durante 30 min previamente a su tratamiento durante 2 h con los agonistas del NMDAR (**Fig. R14A**). Además, utilizamos como control cultivos en los que el pretratamiento con los péptidos fue omitido. Como era de esperar, los niveles del receptor FL detectados con los anticuerpos panTrkB y TrkB-FL Ct sufrieron una notable disminución en los cultivos que no recibieron péptidos cuando se expusieron a las condiciones excitotóxicas. Una reducción similar se obtuvo con el péptido control TMyC y con la mayor parte de los péptidos TFL desarrollados. Por el contrario, el tratamiento con TFL₄₅₇ consiguió interferir de manera estadísticamente significativa el procesamiento de TrkB-FL tras 2 h con NMDA. Así, la cuantificación de los niveles de TrkB-FL detectados con el anticuerpo panTrkB y normalizados respecto a NSE en tres experimentos independientes mostró que éstos solo sufrían una reducción moderada en las condiciones de excitotoxicidad, alcanzando un valor medio del $80 \pm 7\%$ ($p < 0.5$) en comparación con cultivos controles no incubados con péptido ni NMDA (**Fig. R14B**). Estos resultados contrastaban considerablemente con los obtenidos en las células preincubadas con TMyC ($36 \pm 11\%$) o sin péptido alguno ($40 \pm 4\%$) y tratadas con NMDA. La mayor estabilidad del receptor proporcionada por TFL₄₅₇ era debida, al menos en parte, a una reducción parcial en la aparición del fragmento de 32 kDa originado por la ac-

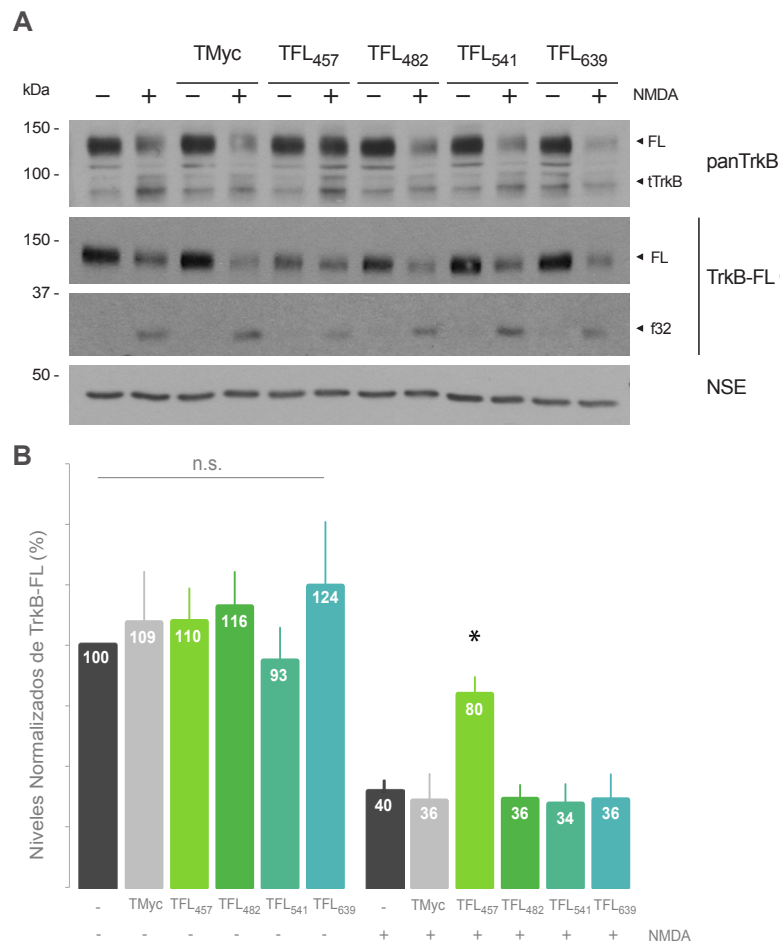


Figura R14. Efecto de los péptidos TFL sobre el procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad. **A**, Análisis por WB de los niveles de TrkB-FL en cultivos corticales preincubados durante 30 min con TMyC o los distintos péptidos TFL (25 μ M) y tratados a continuación con NMDA durante 2 h, comparados con cultivos que no recibieron ningún péptido. **B**, Cuantificación mediante densitometría de los niveles normalizados de TrkB-FL obtenidos en los experimentos anteriores (n=4). Los resultados aparecen representados como porcentaje del valor obtenido en neuronas no preincubadas con péptido ni tratadas con NMDA, al que asignamos arbitrariamente el 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de ANOVA seguida de un test post-hoc HSD de Tukey. (* $p < 0.05$).

ción de calpaína (**Fig. R14A**). También hay que destacar que el tratamiento con los diferentes péptidos, no inducía alteraciones significativas en los niveles basales de TrkB-FL (**Fig. R14B**).

A continuación, quisimos estudiar el efecto de los péptidos TFL en la supervivencia neuronal cuando los cultivos eran sometidos a un ambiente excitotóxico. Para ello, investigamos la viabilidad neuronal resultante del tratamiento de forma crónica con NMDA durante 2-6 h de cultivos primarios previamente incubados con TMyC, TFL₄₅₇, TFL₄₈₂ o TFL₅₄₁. La viabilidad neuronal fue establecida mediante el ensayo de MTT y los resultados de 3-11 experimentos independientes fueron representados como valores relativos respecto a los obtenidos en cultivos tratados con el mismo péptido pero no NMDA. Como puede observarse, los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ presentaron una viabilidad neuronal significativamente mayor respecto a aquellos incubados con el péptido control en todos los tiempos de tratamiento con NMDA evaluados (**Fig. R15A**). Así, la viabilidad de los cultivos en presencia de TMyC disminuyó al $49 \pm 5\%$, $17 \pm 2\%$ y $8 \pm 2\%$ con el tratamiento de NMDA a las 2, 4 y 6 h respectivamente respecto a las células sin tratar, mientras que estos valores alcanzaron el $80 \pm 8\%$ ($p < 0.01$), $50 \pm 5\%$ ($p < 0.001$) y $27 \pm 4\%$ ($p < 0.01$) en los cultivos tratados con TFL₄₅₇. En el caso de TFL₄₈₂ (**Fig. R15B**) y TFL₅₄₁ (**Fig. R15C**), no se observaron diferencias significativas respecto al tratamiento con TMyC, lo cual se correlaciona con la falta de eficacia de estos péptidos a la hora

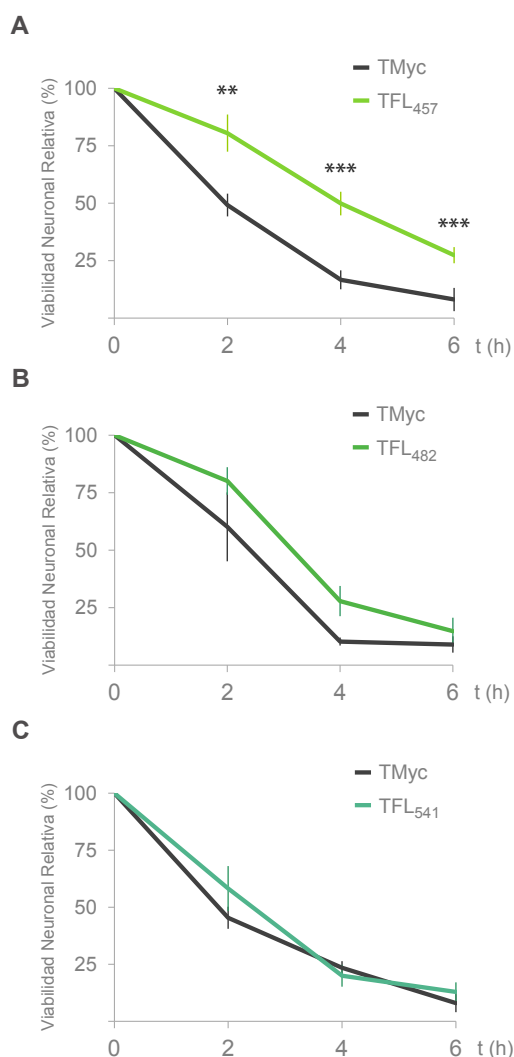


Figura R15. Efecto neuroprotector del péptido TFL₄₅₇ sobre la muerte neuronal excitotóxica.

Cultivos primarios neuronales fueron preincubados durante 30 min con los péptidos TMyC, TFL₄₅₇ (**A**), TFL₄₈₂ (**B**) o TFL₅₄₁ (**C**) (25 μ M) y tratados con NMDA como anteriormente durante 2, 4 o 6 h. La viabilidad neuronal se estableció por el ensayo de MTT y los resultados se presentan como valores medios \pm s.e.m. (n=20 en **A**, n=3 en **B** y n=7 en **C**) en relación a los obtenidos en los cultivos incubados con el péptido correspondiente pero no tratados con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U-Mann Whitney, comparando para cada uno de los tiempos de tratamiento con NMDA la viabilidad neuronal de los cultivos preincubados con TMyC o los diferentes TFLs (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

de prevenir el procesamiento de TrkB-FL en excitotoxicidad (**Fig. R14A y B**). En conjunto, los datos anteriores demostraban que sólo el péptido TFL₄₅₇ tenía un efecto neuroprotector sostenido y significativo sobre la excitotoxicidad inducida por tratamiento crónico con NMDA, que se correspondía con su capacidad para interferir el procesamiento de la proteína TrkB-FL.

Tras haber completado la caracterización de los péptidos previamente descritos, un estudio muy reciente ha demostrado mediante secuenciación de Edman que el sitio de procesamiento por calpaína del receptor TrkB se encuentra entre los aminoácidos 519 y 520 (Jeronimo-Santos et al., 2014), lo que daría lugar a un fragmento teórico de 35 kDa, de tamaño muy similar al observado en nuestros experimentos (**Fig. R16A**). Por tanto, quisimos explorar si un péptido Tat incluyendo la diana descrita sería capaz de prevenir la proteólisis de TrkB-FL por esta proteasa y otorgar un efecto neuroprotector frente a la excitotoxicidad y, en su caso, caracterizar si éste era similar o mayor al de TFL₄₅₇. En esta ocasión, el péptido Tat desarrollado contenía la secuencia 518-532 de TrkB-FL (TFL₅₁₈; **Fig. R16B**). Con el fin de evaluar su capacidad interferente frente al procesamiento de TrkB-FL por calpaína, replicamos las condiciones anteriores de excito-

toxicidad tras preincubar 30 min con los péptidos TMyc, TFL₄₅₇ o TFL₅₁₈. Sorprendentemente, observamos que el péptido TFL₅₁₈ no era capaz de mantener la estabilidad de TrkB-FL ni reducir la aparición de su fragmento intracelular de 32 kDa tras 2 h de tratamiento con NMDA, contrariamente a los resultados obtenidos con TFL₄₅₇ (**Fig. R16C**). Consecuentemente, en los ensayos de viabilidad, en los que las células eran sometidas a diferentes tiempos de tratamiento con NMDA (2-6 h), la preincubación con TFL₅₁₈ tampoco demostró capacidad neuroprotectora respecto del péptido control TMyc y en contraposición al efecto de TFL₄₅₇ (**Fig. R16D**). Una

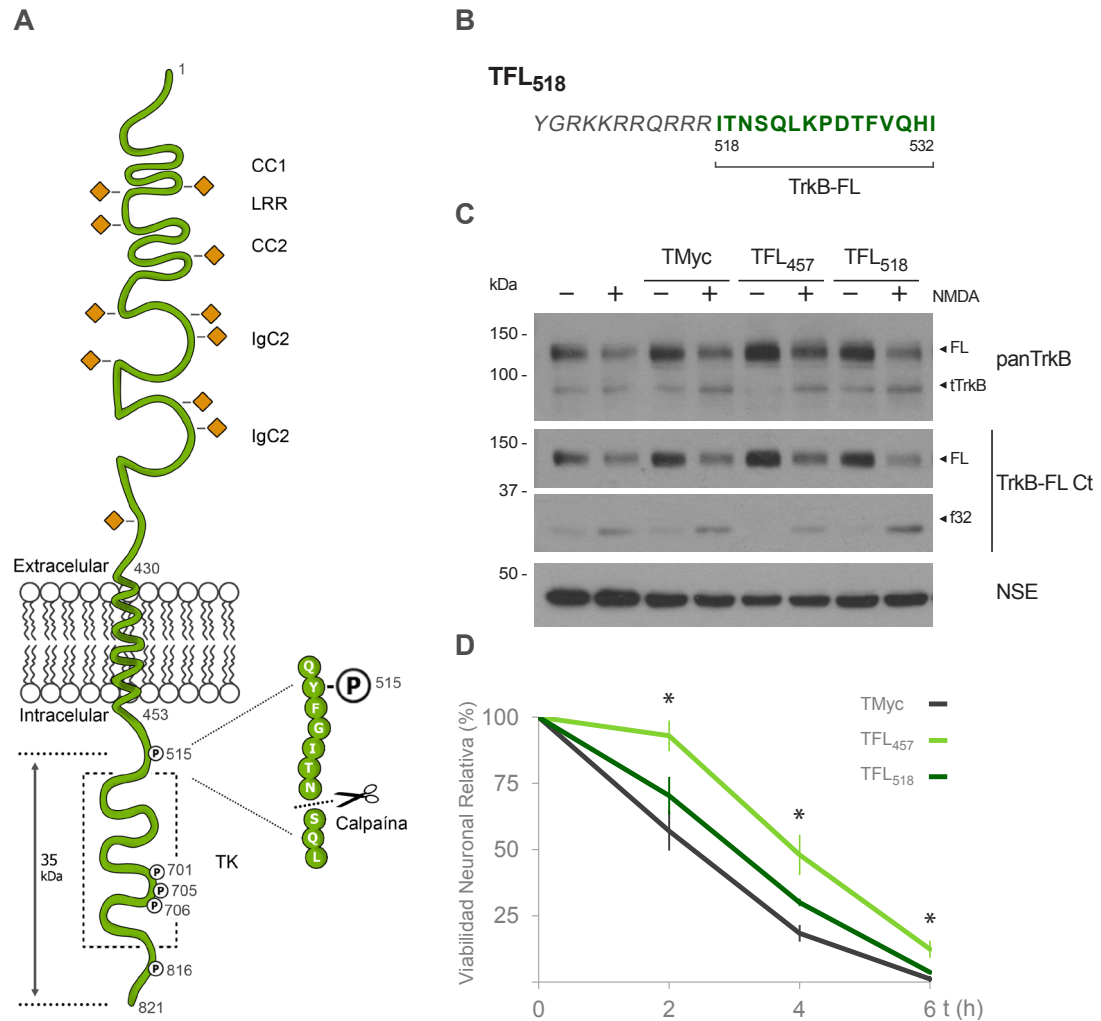


Figura R16. Efecto del péptido TFL₅₁₈ que contiene la secuencia de procesamiento por calpaína de TrkB-FL sobre la muerte neuronal excitotóxica. **A**, Representación esquemática de TrkB-FL mostrando la secuencia de procesamiento por calpaína identificada por (Jeronimo-Santos et al., 2014) y el tamaño teórico del fragmento producido. **B**, Secuencia aminoacídica del péptido TFL₅₁₈. **C**, Estudio mediante WB del efecto de TFL₅₁₈ sobre el procesamiento por calpaína de TrkB-FL en comparación con TMyc y TFL₄₅₇ (25 µM) en cultivos tratados como anteriormente con NMDA por 2 h. **D**, Análisis de la viabilidad neuronal de cultivos tratados con NMDA durante 2, 4 o 6 h y preincubados previamente durante 30 min con TMyc, TFL₄₅₇ o TFL₅₁₈ (n= 3). El estudio estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U-Mann Whitney no mostró diferencias significativas para TFL₅₁₈ en comparación a TMyc, pero se corroboró el efecto neuroprotector de TFL₄₅₇ (**p*<0.05).

posible explicación para justificar la falta de capacidad protectora de TFL₅₁₈, a pesar de contener el sitio específico de procesamiento, es que el reconocimiento de calpaína requiera una región más amplia del receptor TrkB-FL de la incluida en este péptido. De hecho, proteínas interaccionantes con TrkB-FL como FRS2, que se ancla a la tirosina fosforilada en posición 515, muy próxima a la región de procesamiento, es capaz de unirse a péptidos de TrkB de 11 aminoácidos conteniendo este residuo (Zeng et al., 2014). Sin embargo, se ha descrito que tiene más afinidad por péptidos de mayor longitud debido a la importancia de las regiones circundantes para que el péptido adopte una conformación tridimensional adecuada. Aunque esta será una posibilidad a explorar en el futuro, un péptido Tat con una secuencia más larga tendría previsiblemente menor permeabilidad celular y, además, la proximidad de regiones esenciales para la función del receptor podría desencadenar efectos secundarios no deseables. Por ejemplo, incrementar el tamaño del péptido aumentaría las probabilidades de que pudiera modificarse la interacción de TrkB-FL con las proteínas adaptadoras y bloquear sus vías de señalización. Por lo tanto, si bien desconocemos todavía el mecanismo preciso responsable del efecto neuroprotector de TFL₄₅₇, un péptido que probablemente interfiere el procesamiento por calpaína de TrkB-FL de manera indirecta, creemos que este péptido representa una estrategia probablemente más segura y eficaz para tratar de reducir el procesamiento de TrkB-FL inducido en condiciones de excitotoxicidad.

4.2.1 *Efecto del péptido TFL₄₅₇ sobre los niveles de TrkB-FL y otras proteínas importantes para la supervivencia neuronal*

Con el fin de investigar con mayor detalle el vínculo que existe entre el mantenimiento de la supervivencia neuronal y la interferencia del procesamiento de TrkB-FL por acción del péptido TFL₄₅₇, realizamos un estudio del curso temporal de dicho procesamiento. De igual manera, quisimos saber la repercusión que este efecto pudiera tener en la preservación de importantes vías de supervivencia en las que este receptor está implicado. Para ello, los cultivos primarios fueron incubados como anteriormente con TMyc o TFL₄₅₇ (25 μ M) durante 30 min, previamente a su tratamiento con NMDA durante 2-6 h. El análisis de los niveles de TrkB con el anticuerpo pan-TrkB mostró, en ambos casos, la reducción de TrkB-FL y el aumento progresivo de las formas truncadas tTrkB desde tiempos tempranos de tratamiento con NMDA (**Fig. R17A**). No obstante, los cultivos pretratados con el péptido TFL₄₅₇ experimentaron una reducción de los niveles de TrkB-FL considerablemente menor a la obtenida en presencia de TMyc. La cuantificación de los resultados correspondientes a 6 experimentos independientes mostró que las diferencias observadas entre los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ y TMyc eran estadísticamente significativas a las 2 y 4 h de tratamiento con NMDA (**Fig. R17B**). Por otra parte, el incremento gradual en los niveles de la isoforma TrkB-T1 característico de las condiciones excitotóxicas, no se vio afectado por el tratamiento con los péptidos (**Fig. R17A y B**). Sin embargo, la estabilización de TrkB-FL en los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ tuvo como consecuencia importante la preservación de los niveles de otros sustratos de calpaína que están íntimamente relacionados con la

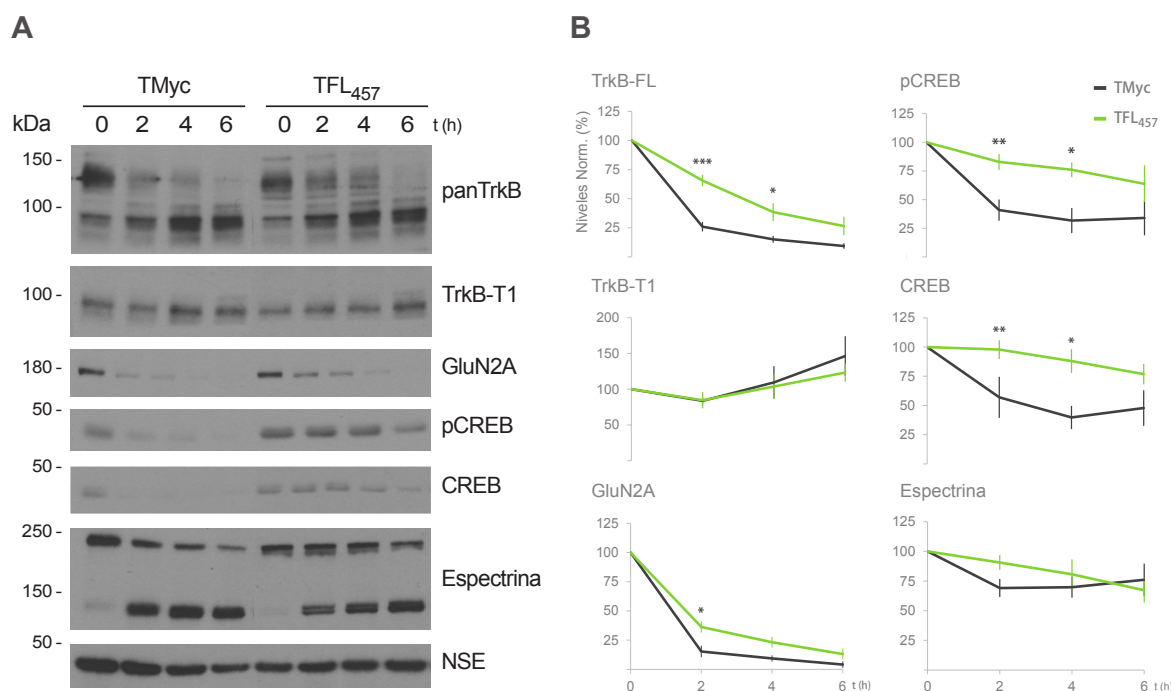


Figura R17. Cinética del efecto mediado por TFL₄₅₇ sobre TrkB-FL y otras proteínas esenciales para la supervivencia neuronal en excitotoxicidad. **A**, Estudio mediante WB de los niveles de los receptores TrkB, GluN2A, CREB y su forma fosforilada en S133 (pCREB) de cultivos sometidos a condiciones excitotóxicas en presencia de TMyC o TFL₄₅₇ (25 μ M). **B**, Cuantificación densitométrica (n=6) de los niveles normalizados de TrkB-FL, TrkB-T1, GluN2A, CREB, pCREB y espectrina en las condiciones anteriores. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido del test U de Mann Whitney, comparando los niveles obtenidos en los cultivos preincubados con TMyC o TFL₄₅₇ para cada tiempo de NMDA (* p <0.05, ** p <0.01).

función de este receptor en supervivencia neuronal. Por una parte, la subunidad GluN2A del NMDAR, que se procesa en condiciones de excitotoxicidad (Gascon et al., 2008b), se estabilizó parcialmente a causa del pretratamiento con TFL₄₅₇ (**Fig. R17B**) y, a las 2 h de tratamiento con NMDA, sus niveles eran significativamente mayores que los obtenidos en cultivos tratados con TMyC (p <0.5). Otra de las proteínas favorecidas por la presencia de TFL₄₅₇ fue el factor de transcripción prosupervivencia CREB. Las condiciones excitotóxicas inducen la inactivación de manera dominante de CREB mediante la defosforilación de su residuo S133 (Hardingham et al., 2002). En esta regulación probablemente también participan la translocación nuclear de la proteína Jacob (Dieterich et al., 2008) y las acciones de calpaína sobre algunos de sus reguladores, ya sea de manera directa, como PKA (Liang et al., 2007), CaMKII (Hajimohammadreza et al., 1997) y CaMKIV (Tremper-Wells and Vallano, 2005), o indirecta, como TrkB (Vidaurre et al., 2012) y NMDAR (Gascon et al., 2008b). El análisis del estado de activación de CREB con un fosfo-anticuerpo específico para su S133 permitió observar que la presencia de TFL₄₅₇ era capaz de mantener sus niveles de actividad muy por encima de los observados en los cultivos incubados con TMyC tras 2 (p <0.01) o 4 h (p <0.5) de tratamiento con NMDA (**Fig. R17B**). Por otra parte, datos sin publicar de nuestro laboratorio muestran la regulación por calpaína de los niveles totales de CREB en condiciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral, procesamiento

que podría contribuir con los mecanismos anteriores a la pérdida de actividad de este factor de transcripción. De hecho, recientemente se ha propuesto que la disminución en los niveles de CREB en el cerebro de pacientes de Alzheimer es debida a la activación de la calpaína, y que este procesamiento provoca una pérdida de su función transcripcional que causa alteraciones en la adsorción y metabolismo de la glucosa (Jin et al., 2013). Por tanto, como cabía esperar, el tratamiento con NMDA de los cultivos neuronales preincubados con TMyc dio lugar a una reducción progresiva de los niveles totales de CREB (**Fig. R17A**). Sin embargo, de manera simultánea al mantenimiento de su estado de fosforilación, el péptido TFL₄₅₇ también previno de forma significativa el procesamiento de CREB a las 2 ($p < 0.01$) y 4 h ($p < 0.5$) de iniciarse el proceso de excitotoxicidad (**Fig. R17B**). Finalmente, conviene resaltar la especificidad de los efectos ejercidos por el péptido TFL₄₅₇ sobre proteínas estrechamente interrelacionadas con las vías de supervivencia de TrkB, mientras que el procesamiento de otros sustratos de calpaína como la espectrina presentaban una cinética similar en los cultivos pretratados con TFL₄₅₇ o TMyc (**Fig. R17B**). En todos los casos, los efectos ejercidos por TFL₄₅₇ sobre la regulación de TrkB-FL, GluN2A y CREB en excitotoxicidad presentaban una cinética muy similar a la observada previamente para la viabilidad neuronal, reforzando la correlación existente entre ambos fenómenos. Por tanto, podemos concluir que, mediante la interferencia del procesamiento de TrkB-FL, el péptido TFL₄₅₇ es capaz de preservar específicamente otras vías relacionadas de supervivencia neuronal dependientes del NMDAR y CREB que, conjuntamente, podrían contribuir a disminuir de manera eficiente la muerte neuronal en respuesta al daño excitotóxico.

4.2.2 Dosis óptimas de uso del péptido TFL₄₅₇

A continuación, investigamos si dosis de TFL₄₅₇ menores a 25 μ M lograban conseguir los mismos efectos sobre TrkB-FL y CREB, así como sobre la supervivencia neuronal, en condiciones de excitotoxicidad. En esta ocasión, los cultivos primarios fueron incubados con distintas concentraciones de TMyc o TFL₄₅₇ (5, 15 o 25 μ M) durante 30 min previamente a su tratamiento con los agonistas del NMDAR durante 2 (**Fig. R18A**) o 4 h (**Fig. R18B**). El análisis de los niveles de TrkB-FL en los cultivos preincubados con TMyc mostró resultados similares a los anteriores a todas las concentraciones de péptido empleadas. Por el contrario, TFL₄₅₇ fue capaz de interferir el procesamiento de TrkB-FL inducido por NMDA, de forma modesta a la menor concentración empleada y muy notablemente para 15 y 25 μ M (**Fig. R18A**). Además, su acción sobre la estabilidad del factor de transcripción CREB y su actividad fueron muy evidentes, incluso con la menor dosis de TFL₄₅₇ utilizada, comparado con los cultivos pretratados con TMyc y sometidos a excitotoxicidad.

Con respecto al efecto de TFL₄₅₇ en la supervivencia neuronal, las tres concentraciones de péptido analizadas consiguieron mantener la viabilidad de los cultivos por encima de aquellos incubados con el péptido control. Los resultados de 6 experimentos independientes de-

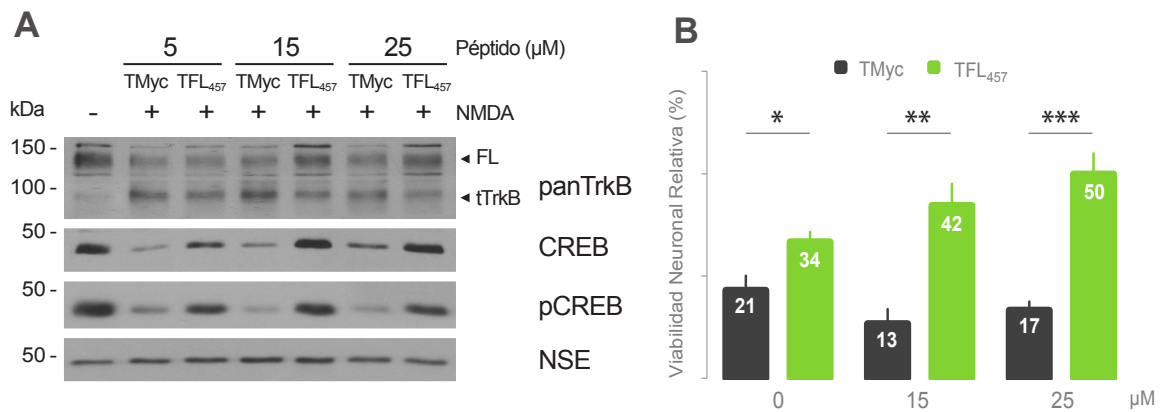


Figura R18. Análisis del efecto de la dosis de péptido TFL₄₅₇ sobre el procesamiento de TrkB-FL y la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad. **A**, Análisis mediante WB de diferentes concentraciones de TMyc o TFL₄₅₇ (5, 15 o 25 μM) en cultivos neuronales tratados a continuación con NMDA durante 2 h, en comparación con un cultivo control mantenido en condiciones basales. **B**, Viabilidad neuronal de cultivos preincubados con las distintas concentraciones de TMyc o TFL₄₅₇ y tratados seguidamente con NMDA por 4 h. Los resultados se presentan como valores relativos medios \pm s.e.m. (n=6) respecto a los obtenidos en cultivos control pre-tratados con una concentración igual del mismo péptido pero no tratados con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100%. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido del test de U de Mann Whitney (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

mostraron que las diferencias más significativas se encontraron para la concentración de 25 μM, donde la viabilidad de los cultivos incubados con NMDA en presencia de TFL₄₅₇ fue del $50 \pm 5\%$ ($p < 0.001$) respecto a las células incubadas con el mismo péptido pero no NMDA, mientras que los tratados con TMyc alcanzaron un nivel del $17 \pm 2\%$ (**Fig. R18B**). Los datos anteriores demuestran que el péptido TFL₄₅₇ tiene un efecto neuroprotector significativo sobre la excitotoxicidad inducida por tratamiento crónico con NMDA que es dependiente de la dosis. Dicho efecto se corresponde con la capacidad de TFL₄₅₇ para interferir el procesamiento de la proteína TrkB-FL y con el mantenimiento de los niveles y actividad de otras proteínas implicadas en las vías de supervivencia, como el factor de transcripción CREB.

4.2.3 Efecto neuroprotector del péptido TFL₄₅₇ en un modelo celular de daño agudo

El modelo celular utilizado en los experimentos anteriores, en el que neuronas previamente expuestas al péptido neuroprotector son enfrentadas a un estímulo excitotóxico crónico, intenta reproducir una situación clínica en la que tratásemos de reducir la muerte neuronal secundaria de un paciente que ha sufrido un ictus mediante la administración post-isquemia de un péptido neuroprotector para frenar la progresión del infarto a las neuronas de la penumbra isquémica. A fin de evaluar de una manera más global el potencial neuroprotector del péptido TFL₄₅₇ para su uso en clínica, también nos pareció interesante investigar su eficacia cuando se utiliza inmediatamente tras la inducción de un daño neuronal agudo, paradigma experimental que simularía

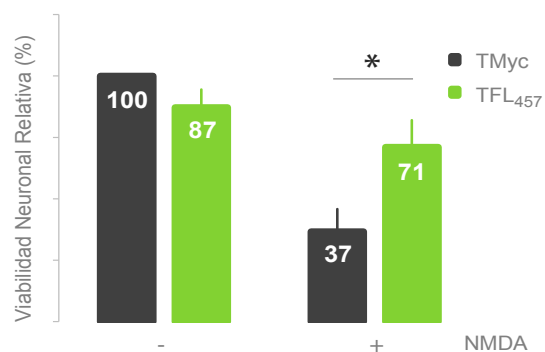


Figura R19. Efecto neuroprotector de TFL₄₅₇ añadido después de la inducción de un daño agudo excitotóxico. Cultivos primarios neuronales fueron tratados con NMDA (50 μ M) y glicina (10 μ M) durante 1 h. A continuación, este medio fue sustituido por medio condicionado libre de agonistas conteniendo el antagonista del NMDAR DL-AP5 (200 μ M) y los péptidos TFL₄₅₇ o TMyC (15 μ M). La viabilidad neuronal se estableció como anteriormente por el ensayo de MTT 20 h después del cambio de medio. Los resultados se presentan como valores relativos respecto a los obtenidos en los cultivos incubados con TMyC y no tratados con NMDA, a los que arbitrariamente se asignó un valor del 100% (n=5). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el test de la *t* de Student desapareada (**p*<0.05).

procesos de isquemia producidos como consecuencia de cirugías endovasculares y cardíacas. El proceso de excitotoxicidad tiene carácter irreversible una vez superado un umbral crítico, pasado el cual no es posible bloquearlo con antagonistas del NMDAR (Hartley and Choi, 1989). Por tanto, los cultivos primarios fueron tratados con NMDA (50 μ M) y glicina (10 μ M) durante 1 h, sustituyéndose este medio a continuación por un medio libre de agonistas y conteniendo el antagonista genérico del NMDAR, DL-AP5 (200 μ M), lo que permitió limitar la sobreactivación del receptor a un corto periodo de tiempo. Los péptidos TFL₄₅₇ o TMyC (15 μ M) fueron añadidos en el medio junto con el DL-AP5 y la viabilidad neuronal se estableció mediante ensayos de MTT 20 h después de realizado el cambio de medio. Los resultados de 5 experimentos independientes se representaron como valores relativos a los obtenidos en los cultivos incubados con TMyC pero no tratados con NMDA (**Fig. R19**). Como cabía esperar, la viabilidad neuronal de los cultivos tratados con el péptido control TMyC se redujo hasta alcanzar un $37 \pm 9\%$ a las 20 h de la inducción del daño excitotóxico agudo. Sin embargo, el nivel de daño fue notablemente inferior en las neuronas tratadas con TFL₄₅₇ que alcanzaron una viabilidad neuronal del $71 \pm 10\%$, valor significativamente mayor al establecido en los cultivos tratados con TMyC (*p*<0.05). Estos resultados demuestran que el péptido TFL₄₅₇ tiene capacidad neuroprotectora tanto cuando se encuentra presente en neuronas que son sometidas a un estímulo excitotóxico de manera crónica como si se administra inmediatamente después de la inducción de un daño agudo.

4.2.4 Mecanismos de señalización implicados en la acción neuroprotectora de TFL₄₅₇

La activación de los receptores TrkB-FL da lugar a la transfosforilación de determinadas tirosinas situadas fuera del dominio catalítico (Y515 y Y816) que actúan como sitios de anclaje para diversas moléculas adaptadoras (Cunningham and Greene, 1998), permitiendo el inicio de tres cascadas principales de señalización: las vías MAPK/ERK, PI3K y PLC γ . Por ello, quisimos evaluar el estado de fosforilación de estos residuos de TrkB-FL tras el tratamiento

con NMDA y el posible efecto del péptido TFL₄₅₇ sobre ellos y las cascadas de señalización reguladas por su fosforilación. Observamos que los cultivos celulares preincubados con este péptido y sometidos a condiciones excitotóxicas por diferentes periodos de tiempo (2-6 h) mostraban una fosforilación más sostenida en el residuo Y816 de TrkB-FL que aquellos tratados con TMyc, en los que se producía una reducción muy temprana y notable en los niveles de pY816 (**Fig. R20A**). Así, la cuantificación de 4 experimentos independientes mostró unos niveles relativos de pTrkB Y816 del $79 \pm 9\%$ a las 2 h de tratamiento con NMDA en los cultivos incubados con TFL₄₅₇, que eran significativamente superiores a los obtenidos en presencia de TMyc ($47 \pm 9\%$, $p < 0.05$) (**Fig. R20B**). La fosforilación en este residuo también pudo observarse en los fragmentos intracelulares f42 y f32 resultantes del procesamiento de TrkB-FL inducido por el NMDA, que contienen este residuo (**Fig. R20A**). A diferencia de la Y816, el estado de fosforilación de la Y515 disminuyó de forma similar en excitotoxicidad tanto en presencia de TMyc como de TFL₄₅₇ ($n=7$), a pesar de los mayores niveles de TrkB-FL que poseen estos últimos (**Fig. R20A** y **R20B**). Estos datos ponen de manifiesto la acción de otros mecanismos independientes al procesamiento que también interfieren la actividad de TrkB-FL en excitotoxicidad y podrían explicar los resultados anteriores. Uno de ellos es la activación de la tirosin fosfatasa Shp-2 (*Src homology-2 domain-containing phosphatase-2*) inducida por el flujo masivo de calcio, que se une al receptor TrkB y suprime la activación de Ras y sus efectores Erk y Akt, dependientes de la fosforilación de la Y515 (Rusanescu et al., 2005).

Complementando los experimentos anteriores, seguidamente utilizamos inhibidores selectivos de las principales rutas de señalización activadas por el receptor TrkB-FL para caracterizar en cuales de ellas pudiera estar incidiendo el péptido neuroprotector TFL₄₅₇. Para ello, los cultivos primarios fueron preincubados con el inhibidor de PI3K Wortmannin (100 nM), el de MAPK/ERK UO126 (300 nM) o el de PLC γ U-73122 (5 μ M) y, 30 min después, con los péptidos TMyc o TFL₄₅₇ (25 μ M). Tras 30 min adicionales, los cultivos se trataron de forma crónica con NMDA (4 h) (**Fig. R20C**). La cuantificación de 5 experimentos independientes permitió establecer que la viabilidad de los cultivos tratados con NMDA y TFL₄₅₇ expuestos a Wortmannin o UO126 era similar a la de aquéllos en los que no se había utilizado ningún inhibidor. Únicamente la inhibición de PLC γ con U-73122 consiguió bloquear el efecto neuroprotector de TFL₄₅₇, siendo la supervivencia de los cultivos sometidos a excitotoxicidad y pretratados con TFL₄₅₇ ($27 \pm 5\%$) similar a la de aquellos incubados con TMyc ($17 \pm 5\%$), y significativamente inferior a aquellos que no recibieron inhibidor ($45 \pm 4\%$) ($p < 0.05$). El conjunto de estos datos demuestra que la acción del péptido TFL₄₅₇ en la supervivencia neuronal requiere la activación de la ruta de señalización de PLC γ , que es reclutada por la fosforilación de la Y816 de TrkB-FL, mientras que las vías de PI3K-Akt y MAPK/ERK, asociadas a la fosforilación de la Y515, no estarían implicadas en este efecto neuroprotector. Resulta interesante la correlación observada entre estos resultados y el mantenimiento del estado de fosforilación de la proteína TrkB-FL tras la inducción de excitotoxicidad en presencia de TFL₄₅₇. Alteraciones en la expresión y activación de PLC γ han sido descritas como importantes en la muerte neuronal asociada con

diversas patologías del SNC (revisado en Jang et al., 2013). Por tanto, nuestros datos sugieren que mediante el mantenimiento parcial de la proteína pTrkB-FL Y816 en condiciones de excitotoxicidad, el péptido neuroprotector TFL₄₅₇ es capaz de interferir la supresión de las rutas de señalización activadas por PLC γ , que juegan papeles clave en la supervivencia neuronal.

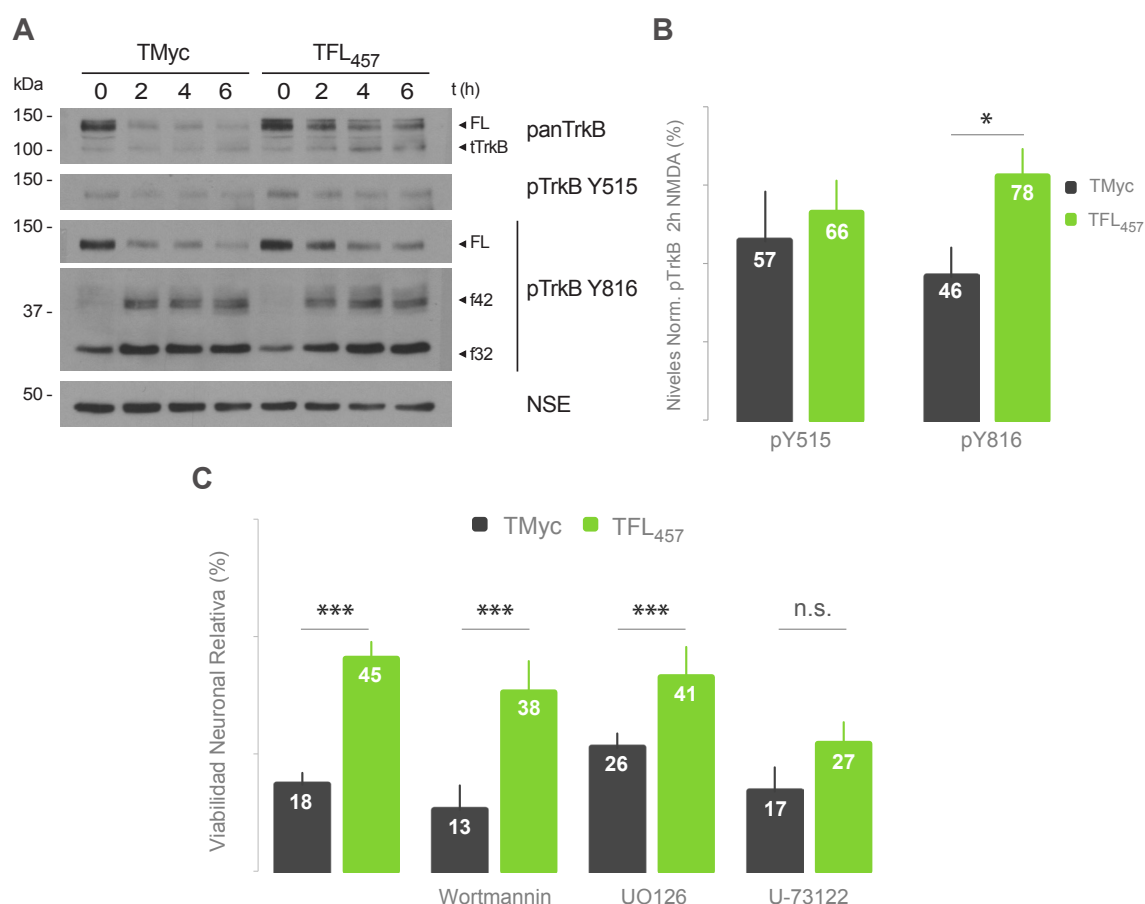


Figura R20. Vías de señalización implicadas en el efecto neuroprotector de TFL₄₅₇. **A**, Análisis por WB del estado de fosforilación en los residuos Y515 y Y816 de TrkB-FL en cultivos celulares preincubados con TMyC o TFL₄₅₇ (25 μ M) y sometidos posteriormente a condiciones excitotóxicas por los tiempo indicados. **B**, Cuantificación mediante densitometría de los niveles normalizados de fosforilación en Y515 y Y816 de TrkB-FL tras 2 h de NMDA en presencia de TMyC o TFL₄₅₇. La gráfica representa los valores medios \pm s.e.m. ($n=7$ para pY515 y $n=4$ para Y816) respecto a los obtenidos en cultivos tratados con su péptido correspondiente pero sin incubar con NMDA, a los que se adjudicó el valor arbitrario 100%. El análisis estadístico se realizó por el test de la t de Student desapareada (* $p<0.05$). **C**, Evaluación de la supervivencia neuronal en presencia de TMyC o TFL₄₅₇ (25 μ M) de cultivos sometidos a un ambiente excitotóxico durante 4 h en los que se ha producido la inhibición de PI3K (Wortmannin, 100 nM), MAPK/ERK (UO126, 300 nM) o PLC γ (U-73122, 5 μ M) comparados con cultivos en los que no se utilizó ninguno de estos inhibidores. Los valores promedios \pm s.e.m. ($n=6$) aparecen representados en relación a cultivos controles mantenidos en condiciones basales durante los mismos tiempos (100%). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann Whitney (** $p<0.001$).

4.2.5 Acción de TFL₄₅₇ sobre los mecanismos proteolíticos que actúan sobre TrkB-FL en excitotoxicidad

Como hemos visto, la regulación de TrkB-FL en excitotoxicidad se debe en gran medida a la acción proteolítica de calpaína (**Fig. R6**) (Vidaurre et al., 2012), aunque existen indicios de posibles mecanismos proteolíticos adicionales. Por otra parte, la secuencia de TrkB-FL contenida en el péptido TFL₄₅₇ se localiza relativamente alejada del sitio de procesamiento de esta enzima en el receptor (**Fig. R15A**), sugiriendo que sus acciones sobre el procesamiento por calpaína de TrkB-FL y otras moléculas críticas para la supervivencia neuronal (**Figs. R14 y R17**) podrían ser indirectas, o incluso estar actuando sobre mecanismos adicionales de regulación. Por esta razón, decidimos comparar el efecto de TFL₄₅₇ sobre la supervivencia neuronal en condiciones de excitotoxicidad respecto al tratamiento con inhibidores específicos de calpaína. Para ello, los cultivos primarios corticales fueron preincubados con una combinación de los inhibidores de calpaína, calpeptina (Calp, 10 μ M) e inhibidor III (CiIII; 10 μ M) y, 30 min después, con los péptidos TMyC o TFL₄₅₇ (25 μ M). Transcurridos 30 min adicionales, los cultivos se trataron de forma crónica con NMDA (4 h) (**Fig. R21A**). En los cultivos control preincubados con TMyC observamos un efecto modesto pero significativo de los inhibidores de calpaína sobre la viabilidad neuronal ($28 \pm 3\%$ *versus* $21 \pm 2\%$, $p < 0.05$), similar a resultados previos (Rami et al., 1997). Sin embargo, el efecto neuroprotector de TFL₄₅₇ fue muy similar independientemente del tratamiento o no con los inhibidores de la proteasa ($48 \pm 5\%$ *versus* $47 \pm 3\%$) lo que sugiere que las acciones del péptido y los inhibidores de calpaína no son independientes, y por tanto aditivas, sino que están relacionadas. Además, estos resultados también demuestran que TFL₄₅₇ posee una capacidad neuroprotectora frente al daño excitotóxico mucho mayor que la de los inhibidores genéricos de calpaína, y permiten proponer efectos adicionales de este péptido sobre procesos independientes de esta proteasa. En resumen, el efecto neuroprotector de TFL₄₅₇ en excitotoxicidad parece derivar de sus acciones sobre el procesamiento por calpaína de TrkB-FL junto con otras proteínas prosupervivencia, y las que ejerce sobre mecanismos independientes de ella, que deben jugar un papel esencial en la muerte neuronal.

Anteriormente habíamos demostrado que el procesamiento de TrkB-FL en excitotoxicidad generaba fragmentos intracelulares resultantes de la acción de calpaína (f32) y de otros sistemas proteolíticos sin identificar (f42) (**Fig. R6**). Estos resultados junto con los del experimento anterior nos llevaron a proponer que TFL₄₅₇ podría estar actuando sobre ambos tipos de procesamiento y tener como diana calpaína y sistemas proteolíticos alternativos. Por tanto, analizamos el efecto de este péptido sobre la producción de los fragmentos intracelulares de TrkB-FL en excitotoxicidad, para lo cual preincubamos nuevamente los cultivos cerebrales con TFL₄₅₇ o con TMyC por 30 min antes de la adición de NMDA durante 2 h (**Fig. R21B**). El análisis de 6 experimentos independientes con el anticuerpo TrkB-FL Ct demostró que TFL₄₅₇ reducía a un $69 \pm 6\%$ la aparición de f32 en comparación con los cultivos que no habían recibido péptido, y que este efecto era específico y no se observaba para el tratamiento con TMyC ($102 \pm 15\%$), siendo las di-

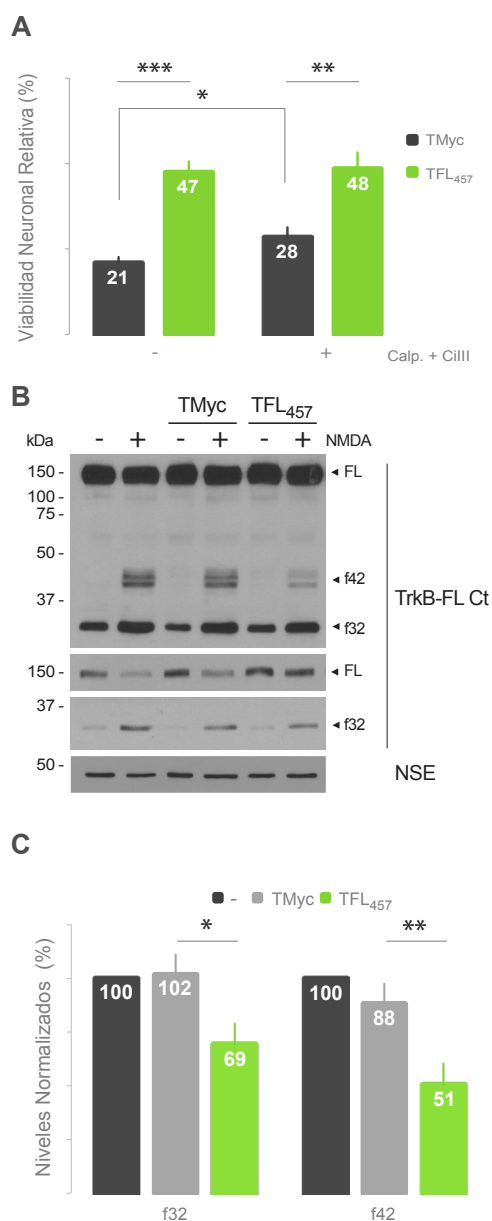


Figura R21. Caracterización de factores dependientes e independientes de calpaína en los efectos de TFL₄₅₇ sobre el procesamiento de TrkB-FL y la muerte neuronal. **A**, Viabilidad neuronal en cultivos preincubados durante 1 h con calpeptina (Calp) e inhibidor III (CiIII; ambos a concentración 10 μ M) según se indica y, 30 min después con los péptidos TMyC o TFL₄₅₇ (25 μ M). Transcurridos 30 min adicionales, los cultivos se trataron con NMDA como anteriormente por 4 h. La gráfica muestra valores relativos (n=10) respecto a los obtenidos en cultivos control que no fueron tratados con ningún compuesto (100%). Los cálculos estadísticos se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de un test de U de Mann Whitney (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001). **B**, Estudio por WB de la acción interferente de TFL₄₅₇ sobre la producción de fragmentos intracelulares derivados del procesamiento de TrkB-FL tras 2 h con NMDA. Se muestran distintas exposiciones de la misma membrana para facilitar la visualización de los diferentes polipéptidos. **C**, Cuantificación densitométrica de los niveles normalizados de f32 y f42 (n=5) respecto los obtenidos en cultivos tratados con NMDA pero sin péptido (100%). El análisis estadístico se realizó por la prueba de la t de Student desapareada (* p <0.05, ** p <0.01).

ferencias entre los cultivos tratados con ambos péptidos estadísticamente significativas (p <0.05) (**Fig. R21C**). La acción preventiva de TFL₄₅₇ sobre la aparición de f42, un fragmento intracelular que no es resultado de la acción de calpaína, fue mucho más evidente. Los niveles de f42 se redujeron hasta un $51 \pm 10\%$ en los cultivos pretratados con TFL₄₅₇, valor significativamente inferior al de las neuronas incubadas con TMyC ($88 \pm 9\%$, p <0.01). Por tanto, podemos concluir que el péptido TFL₄₅₇ es capaz de mantener los niveles de TrkB-FL en excitotoxicidad previniendo parcialmente la acción de calpaína y, además, interfiriendo otros sistemas proteolíticos que deben tener un papel fundamental en la estabilidad del receptor y en la viabilidad neuronal.

5. Caracterización del procesamiento de TrkB-FL en excitotoxicidad dependiente de metaloproteinasas

Como siguiente objetivo nos propusimos investigar los mecanismos responsables del procesamiento de TrkB-FL que dan lugar a la generación de f42 puesto que, según los resultados anteriores, se trataría de un proceso independiente de calpaína que también podría ser relevante en excitotoxicidad. Según la movilidad relativa de este fragmento, la proteólisis debería producirse en una zona próxima a la región transmembrana de TrkB-FL, no muy alejada de donde se encuentra la secuencia aminoacídica que contiene TFL457. Una gran cantidad de receptores unipaso son procesados de manera secuencial en las inmediaciones de su región transmembrana, primero por metaloproteinasas que actúan en su zona extracelular, desprendiendo su ectodominio al medio extracelular, y a continuación por un corte intramembrana llevado a cabo por γ -secretasas (Beel and Sanders, 2008, Bai and Pfaff, 2011). Estos procesos de proteólisis intramembrana regulada (*regulated intramembrane proteolysis*, RIP) son esenciales en el sistema nervioso, donde tienen papeles muy importantes en la comunicación intercelular y de las células con el ambiente extracelular, resultando alterados en diversas patologías como la enfermedad de Alzheimer (Lal and Caplan, 2011, Lichtenthaler et al., 2011). En condiciones de excitotoxicidad, las metaloproteinasas resultan activadas (Jourquin et al., 2003), posiblemente debido a un proceso de S-nitrosilación mediado por el NO producido tras la sobreactivación del NMDAR (Gu et al., 2002). Por tanto, decidimos investigar la posible implicación de estas proteasas en el procesamiento de TrkB-FL y la formación de f42 en excitotoxicidad. Para ello, los cultivos celulares fueron incubados con los inhibidores específicos de metaloproteinasas TAPI-2 (10 μ M) o el inhibidor de γ -secretasas *Compound E* (1 μ M) por 30 min y, posteriormente, con NMDA durante 6 h (**Fig. R22A**). Pudimos comprobar que la formación de f42 en excitotoxicidad se inhibía al impedir la acción de las metaloproteinasas, pero no al bloquear la actividad de las γ -secretasas. Sin embargo, la supresión de este mecanismo no incrementaba en gran medida la estabilidad de la isoforma completa, posiblemente por el procesamiento que sigue ejerciendo calpaína en estas condiciones. Al mismo tiempo, investigamos en estos mismos cultivos si el procesamiento del receptor de neurotrofinas por metaloproteinasas daba lugar a la liberación de su ectodominio al medio de cultivo como ha sido descrito anteriormente para otros sustratos regulados de modo similar (revisado en Ancot et al., 2009). Con el doble objetivo de excluir una posible acumulación del ectodominio de TrkB a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro* (13 días), no relacionada con la inducción del proceso de excitotoxicidad, y facilitar su detección, decidimos cambiar el medio de cultivo por medio fresco sin suero previamente al tratamiento con NMDA. Tras la sobreactivación del NMDAR, utilizamos un segundo anticuerpo panTrkB (panTrkB2) para analizar la posible liberación al medio de fragmentos extracelulares de TrkB durante el tiempo de estimulación (**Fig. R22A**). Este anticuerpo reconoce prácticamente la misma región del receptor que panTrkB, el anticuerpo policlonal utilizado anteriormente, pero al tratarse de un monoclonal pensamos que pudiese tener una sensibilidad mayor, predicción que no fue confirmada. Observamos la aparición en el medio extracelular de un fragmento soluble de TrkB de

aproximadamente 74 kDa (f74) como consecuencia de la inducción del proceso excitotóxico, siendo su formación bloqueada completamente por los inhibidores específicos de las metaloproteinasas pero no de las γ -secretasas, de manera similar a lo anteriormente descrito para f42.

Teniendo en cuenta que el dominio extracelular de TrkB es idéntico para todas las isoformas del receptor, el ectodominio detectado podría corresponder a la isoforma catalíticamente activa, sólo expresada por neuronas, o bien a TrkB-T1, que está presente tanto en neuronas como en glía. Para poder establecer de manera inequívoca que la isoforma TrkB-FL es capaz de liberar un fragmento extracelular a consecuencia de la activación en excitotoxicidad de las metaloproteinasas, cultivos corticales de 7 DIVs se infectaron con el lentivirus LV-HA-TrkB-FL/GFP (m.o.i. 1), que expresa de manera neuroespecífica en la misma célula un receptor recombinante con una etiqueta N-ter de HA como la proteína GFP (**Fig. R22B**). A los 13 DIVs, el medio de las células infectadas fue sustituido por medio condicionado proveniente de cultivos iguales a éstos pero sin infectar, seguido del tratamiento con NMDA durante 4 h. Los cultivos primarios neuronales son altamente dependientes de factores tróficos y de crecimiento que se acumulan progresivamente en el medio de cultivo y, por ello, quisimos excluir que el cambio a medio fresco, como habíamos realizado en los experimentos anteriores, participara de algún modo en la activación del proceso de excitotoxicidad y, consecuentemente, de las metaloproteinasas. Con el fin de facilitar la visualización del ectodominio de TrkB-FL liberado durante el tratamiento con NMDA, una vez recogido el medio procedimos a reducir los nive-

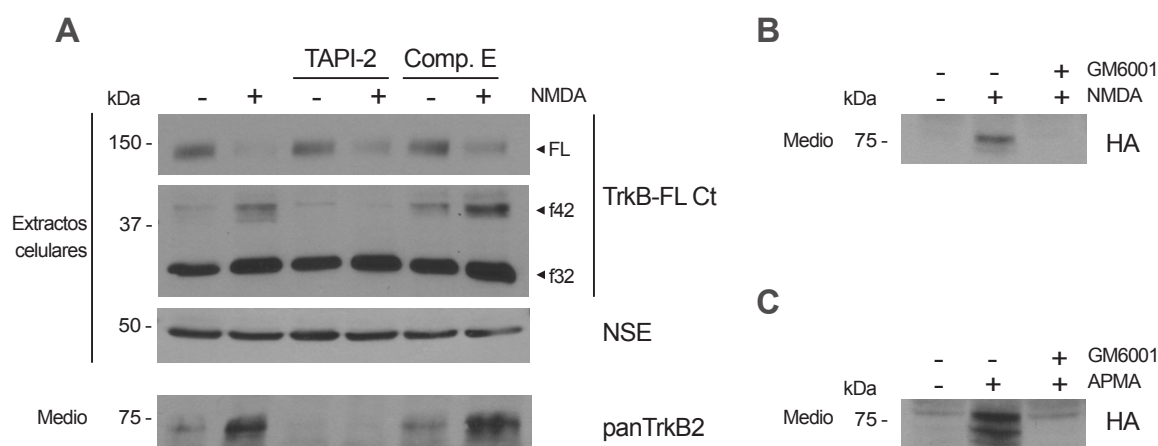


Figura R22. Caracterización del procesamiento de TrkB-FL por metaloproteinasas en excitotoxicidad. **A**, Análisis por WB de los fragmentos derivados de TrkB-FL en cultivos primarios fueron incubados con el inhibidor de metaloproteinasas TAPI-2 (10 μ M) o el inhibidor de γ -secretasas *Compound E* (1 μ M) por 30 min y, posteriormente, con NMDA durante 6 h. El medio de cultivo se sustituyó al inicio del experimento por otro sin suero que fue recolectado una vez finalizado el tiempo de tratamiento y analizado mediante WB con el anticuerpo panTrkB. **B** y **C**, Cultivos infectados con LV-HA-TrkB-FL/GFP se preincubaron con el inhibidor de metaloproteinasas GM6001 (10 μ M) durante 30 min según se indica y posteriormente con NMDA (**B**) o APMA (100 μ M) (**C**) por 4 h. Al comienzo de los tratamientos, el medio de cultivo se cambió por medio condicionado procedente de células incubadas en paralelo pero no infectadas, y posteriormente se analizaron en ellos los niveles de HA por WB.

les de albúmina y otras proteínas abundantes del suero con la ayuda de una matriz de sefarosa azul (*Blue Sepharose 6 Fast Flow*, Travis and Pannell, 1973). El reconocimiento con anticuerpos específicos del epítipo HA, ausente en los receptores endógenos, nos permitió demostrar mediante ensayos de WB que la liberación del ectodominio de la isoforma TrkB-FL es inducida específicamente en condiciones de excitotoxicidad (**Fig. R22B**). Igual que para el receptor endógeno, el uso de inhibidores específicos de las metaloproteinasas como el compuesto GM6001 (10 μ M) impidió el desprendimiento del ectodominio de TrkB-FL. Paralelamente, verificamos la acción de estas enzimas sobre el receptor TrkB-FL tratando cultivos infectados y procesados de igual manera con acetato de 4-aminofenilmercurio (APMA, 100 μ M), un compuesto que activa las metaloproteinasas latentes al liberar sus prodominios (Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990) (**Fig. R22C**). Como era de esperar, el procesamiento de TrkB-FL inducido por el tratamiento con APMA era bloqueado por el inhibidor de metaloproteinasas GM6001. En síntesis, estos datos demuestran la activación de la familia de metaloproteinasas en condiciones de excitotoxicidad, proteasas que son responsables del procesamiento del receptor TrkB-FL en su dominio extracelular, liberando el ectodominio (f74), y generando un fragmento C-terminal (f42). Este fragmento podría permanecer anclado en la membrana plasmática, si bien, como se demostró anteriormente, es susceptible de ser proteolizado ulteriormente por calpaína.

Profundizando en el estudio de este procesamiento, seguidamente analizamos la cinética de liberación del ectodominio de TrkB en excitotoxicidad. Para ello, al inicio del experimento, el medio de cultivo fue sustituido por medio sin suero, como se indicó anteriormente, y los cultivos se incubaron con los agonistas del NMDAR por periodos de tiempo variables (0.5-6 h) (**Fig. R23A**). La liberación del ectodominio al medio extracelular, detectado mediante WB con pan-TrkB2, se producía en paralelo con la disminución de los niveles de TrkB-FL como consecuencia de su procesamiento. El análisis de f74 en 4 experimentos independientes nos indicó que la liberación del dominio extracelular se produce de manera dependiente de la sobreactivación de los NMDARs (**Fig. R23B**). Respecto a los bajos niveles presentes en condiciones basales, tomados como referencia, los niveles de f74 aumentaron significativamente 4 ± 1 veces tan sólo 1 h después de inducir las condiciones excitotóxicas ($p < 0.01$), alcanzándose a partir de las 2 h niveles prácticamente estacionarios. Los resultados sugieren que el procesamiento de TrkB por metaloproteinasas ocurre de manera temprana tras la sobreactivación del NMDAR y el incremento observado a lo largo del tiempo podría indicar una relativa estabilidad del ectodominio en los cultivos. Del mismo modo, la incubación de los cultivos primarios con APMA por los mismos tiempos (0.5-6 h) también indujo de manera significativa la liberación y acumulación del ectodominio de TrkB en el medio extracelular (**Fig. R23C**), incluso de forma más robusta que con la sobreactivación de los NMDARs (**Fig. R23D**). Además, el análisis de los extractos celulares demostró que este tratamiento era capaz de inducir una disminución modesta en los niveles de TrkB-FL y la acumulación de manera progresiva de f42 pero no f32, de acuerdo con la activación de las metaloproteinasas pero no calpaína en estas condiciones (**Fig. R23C**).

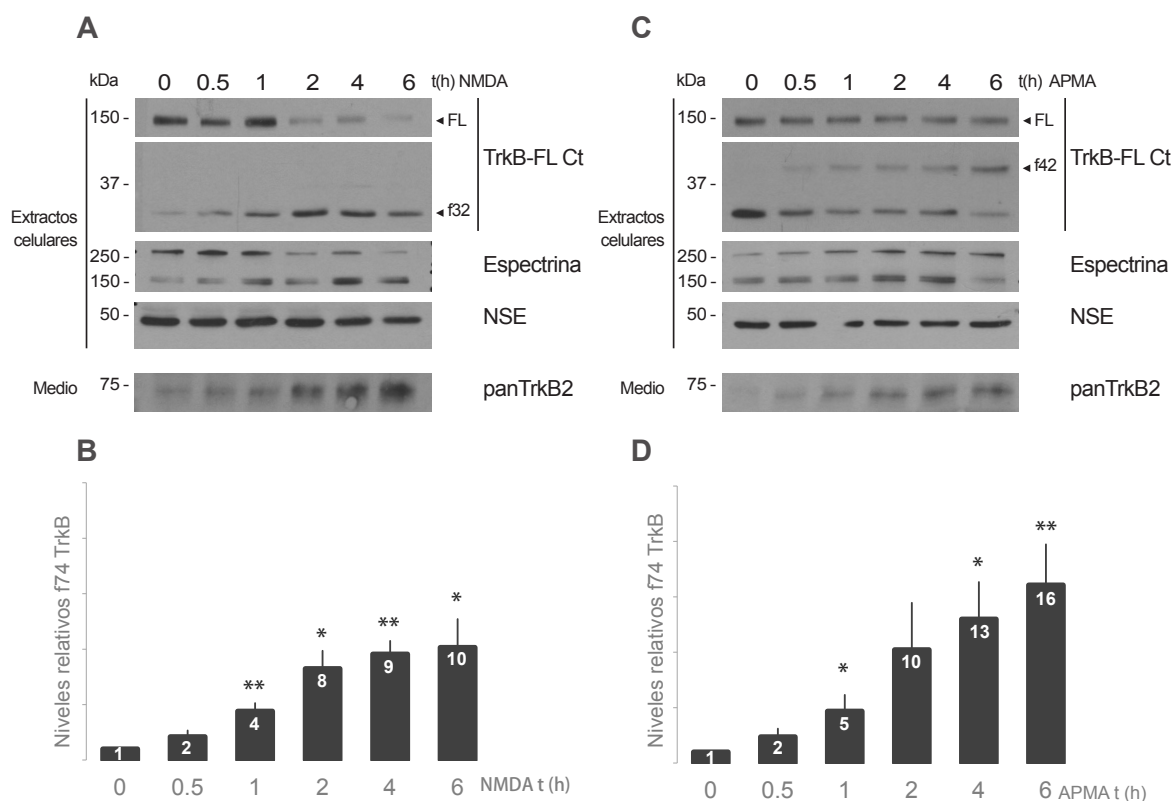


Figura R23. Estudio de la cinética de procesamiento de TrkB-FL por metaloproteinasas y de la liberación de su ectodominio. A y C, Estudio mediante WB de los niveles de TrkB y sus fragmentos resultantes en cultivos neuronales sometidos a diferentes tiempos de tratamiento con NMDA (A) o APMA (C) como anteriormente, sustituyéndose el medio al comienzo del experimento por uno sin suero. B y D, Cuantificación densitométrica de la liberación y acumulación del fragmento extracelular en el curso temporal del tratamiento con NMDA (B) o APMA (D). Se representa el valor promedio \pm s.e.m. (n=4), tomando como referencia el dato registrado en cultivos sin estimular con NMDA, al que se asignó un valor arbitrario de 1. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la *t* de Student desapareada (* p <0.05, ** p <0.01).

Como se mencionó anteriormente, la proteólisis por metaloproteinasas se asocia en muchas ocasiones con un procesamiento secuencial llevado a cabo por γ -secretasas, lo que da lugar a la liberación del dominio intracelular. Por tanto, siendo TrkB-FL un sustrato de metaloproteinasas, podría ser también susceptible al procesamiento por este otro sistema proteolítico. Apoyando esta hipótesis, la observación en algunos experimentos de una proteína con una movilidad relativa de unos 37 kDa que podría ser el resultado de la actividad enzimática de γ -secretasas en las condiciones de excitotoxicidad. En ese caso, la escasa representatividad de este fragmento en relación al resto indicaría que se trataría de un fragmento transitorio formado en excitotoxicidad y rápidamente procesado por calpaína. Con el fin de poner a prueba esta hipótesis, decidimos tratar de estabilizar este fragmento de TrkB-FL incubando los cultivos con los inhibidores de calpaína CiIII y calpeptina de manera conjunta, y combinar este tratamiento con el inhibidor *Compound E*, y así poder determinar si su origen es debido a la actividad de γ -secretasas. Asimismo, quisimos averiguar si el bloqueo conjunto de la actividad de calpaína y metaloproteinasas conseguía mantener en excitotoxicidad niveles mas elevados de TrkB-FL

que cualquiera de los tratamientos por separado. Estos experimentos se llevaron a cabo mediante la incubación de los cultivos celulares con los diferentes inhibidores durante 30 min y un tratamiento posterior durante 4 h con NMDA (**Fig. R24**). La inhibición de calpaína consiguió estabilizar TrkB-FL en condiciones de excitotoxicidad, al tiempo que reducía la aparición de f32 y facilitaba la acumulación de f42, tal como se mostró anteriormente (**Fig. R6**). Sin embargo, cuando utilizamos el inhibidor de γ -secretasas además de los de calpaína no observamos la acumulación de ningún fragmento adicional, siendo los resultados muy similares a los obtenidos solo con los inhibidores de calpaína. Por tanto, estos resultados sugieren que las γ -secretasas no participan en el procesamiento de TrkB-FL en condiciones de excitotoxicidad. Como era de esperar, TAPI-2 logró impedir completamente la generación de f42 y su acción combinada con los inhibidores de calpaína consiguió incrementar ligeramente los niveles del receptor TrkB-FL en condiciones de excitotoxicidad respecto a los obtenidos para los tratamientos individuales. Sin embargo, el uso de inhibidores de metaloproteinasas y de calpaína no preservó de manera absoluta los niveles de TrkB-FL, posiblemente debido a una inhibición incompleta de esta última proteasa, manifestada por el análisis de los BDPs de espectrina, y al componente transcripcional en la regulación de TrkB en excitotoxicidad descrito anteriormente (Vidaurre et al., 2012). La comparación de las acciones individuales de los inhibidores de calpaína y metaloproteinasas sobre los niveles de TrkB-FL en excitotoxicidad sugiere que, cuantitativamente, calpaína tiene probablemente un papel más importante en el procesamiento del receptor.

En conclusión, el conjunto de estos datos demuestra que el procesamiento de TrkB-FL en excitotoxicidad se debe a dos mecanismos independientes. La actividad enzimática de calpaína, probablemente responsable mayoritaria de su proteólisis, y la acción de metaloproteina-

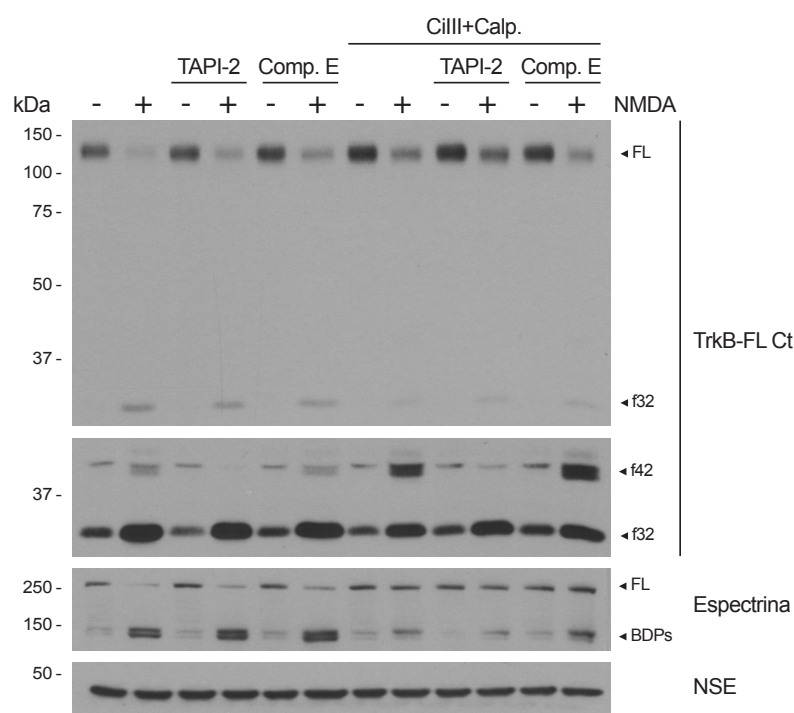


Figura R24. Exclusión de un posible procesamiento de TrkB-FL por γ -secretasas en condiciones de excitotoxicidad. Análisis por WB de extractos celulares procedentes de cultivos preincubados con inhibidores de metaloproteinasas (TAPI-2, 10 μ M), γ -secretasas (Comp. E, 10 μ M) y calpaína (CIII+Calp., ambos a 10 μ M), según se indica, y tratados posteriormente con NMDA durante 6 h.

sas que liberan el ectodominio de TrkB-FL al medio extracelular, fragmento que podría tener implicaciones muy importantes en la alteración de la señalización de la vía BDNF/TrkB. El procesamiento de TrkB-FL por metaloproteinasas también genera un fragmento anclado en la membrana que, a su vez, es susceptible al corte por calpaína. En este caso particular, la acción de las metaloproteinasas no parece estar acoplada a la actividad enzimática de γ -secretasas.

6. Caracterización del procesamiento de TrkB-T1 en condiciones de excitotoxicidad dependiente de metaloproteinasas y γ -secretasas

La isoforma truncada TrkB-T1 comparte la misma región extracelular, transmembrana y primeros 12 aminoácidos intracelulares con la isoforma completa por lo que, de acuerdo a los resultados anteriores, sería susceptible a ser procesada por metaloproteinasas en condiciones de excitotoxicidad, igual que TrkB-FL. Con el fin de testar esta hipótesis, nuestro primer paso fue tratar de visualizar los posibles fragmentos intracelulares de este receptor producidos en condiciones de excitotoxicidad. Para ello, realizamos tratamientos con NMDA durante diferentes periodos de tiempo (0.5-6 h) en cultivos de 13 DIVs (**Fig. R25A**). En este caso, utilizando el anticuerpo específico de la isoforma TrkB-T1 que reconoce su epítipo C-terminal no fuimos capaces de detectar ningún polipéptido que correspondiera con un procesamiento en la región yuxtamembrana. Ello podría ser debido a un carácter transitorio de los fragmentos o a su escasa abundancia relativa, caso de que el mecanismo propuesto inducido por excitotoxicidad fuese cuantitativamente minoritario. Por tanto, decidimos utilizar un estímulo que activase de manera robusta las metaloproteinasas como es el caso de APMA. El tratamiento con este compuesto durante los mismos periodos de tiempo (0.5-6 h) disminuyó de manera eficiente los niveles totales del receptor TrkB-T1, al tiempo que inducía la aparición y acumulación de un

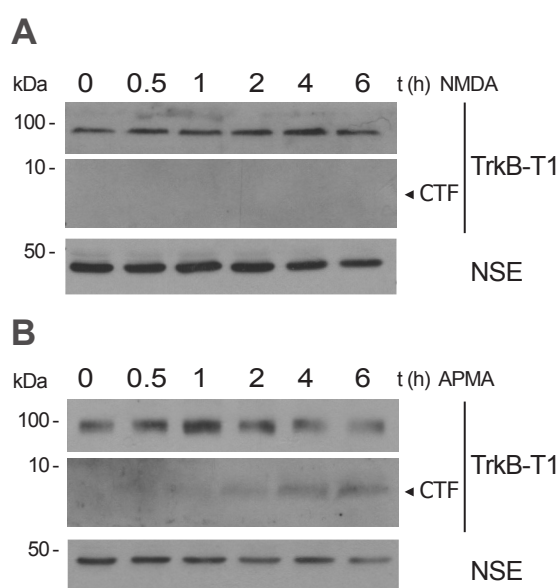


Figura R25. Caracterización del receptor TrkB-T1 endógeno como sustrato de metaloproteinasas. Estudio por WB de los fragmentos derivados del procesamiento de TrkB-T1 por metaloproteinasas en cultivos primarios sometidos a diferentes tiempos de tratamiento con NMDA (**A**) o APMA (**B**).

fragmento de unos 6 kDa cuyo tamaño correspondería con el producto resultante de la acción mediada por metaloproteinasas, y que contendría previsiblemente un corto dominio extracelular, el transmembrana y las regiones intracelulares (*C-terminal fragment*, CTF; **Fig. R25B**). Como hemos mencionado anteriormente, los CTFs generados por la acción de metaloproteinasas son susceptibles en muchos casos de sufrir un procesamiento ulterior por γ -secretasas, liberando al citosol el dominio intracelular (ICD, *intracytoplasmic domain*). No obstante, en este experimento no pudimos observar fragmentos de menor tamaño molecular que pudiesen corresponder al procesamiento por γ -secretasas. Por tanto, los resultados anteriores demuestran que TrkB-T1 es susceptible de proteólisis mediada por metaloproteinasas. Sin embargo, este experimento no demuestra ni excluye que este procesamiento vaya seguido de la acción de γ -secretasas puesto que los ICDs resultantes podrían no haber sido detectados debido a su pequeño tamaño (algo superior a 23 aminoácidos) y/o sus bajos niveles. Los experimentos anteriores tampoco permitieron demostrar la acción de las metaloproteinasas sobre TrkB-T1 en condiciones de excitotoxicidad.

Con objeto de vencer las dificultades previas para el análisis de los posibles fragmentos C-terminales de TrkB-T1 producto de su procesamiento por metaloproteinasas y γ -secretasas, derivadas de lo extremadamente corta que es su región intracelular, recurrimos nuevamente a la generación de vectores lentivirales. Así, el lentivirus LV-HA-TrkB-T1-GFP es capaz de expresar de manera neuroespecífica la isoforma TrkB-T1 fusionada con la proteína GFP en su extremo C-terminal y conteniendo una etiqueta de HA en su extremo N-terminal (**Fig. R26A**). A continuación, los cultivos celulares fueron infectados en paralelo a 7 DIVs con este lentivirus o el virus control LV-GFP, que expresa la proteína GFP, y sometidos 6 días después a la sobreactivación del NMDAR durante tiempos progresivos (2-6 h) (**Fig. R26B**). Las condiciones de excitotoxicidad disminuyeron modestamente los niveles de la proteína de fusión HA-TrkB-T1-GFP, observada tanto con anticuerpos específicos para GFP (ver WB de baja exposición) o HA, y dieron lugar a la aparición y acumulación progresiva de 3 fragmentos con movilidades relativas de 34, 30 y 26 kDa, detectados con el anticuerpo para GFP. El tamaño de estos fragmentos C-terminales sugiere que podrían ser el resultado de reacciones de procesamiento en las inmediaciones de la región transmembrana de TrkB-T1, a excepción del más pequeño que tiene una movilidad similar a GFP y podría corresponder a una pequeña fracción de esta proteína liberada de la proteína de fusión HA-TrkB-T1-GFP por algún mecanismo desconocido. Seguidamente, caracterizamos si los fragmentos de 30 y 34 kDa observados eran resultado de la acción de metaloproteinasas, sistema proteolítico que previamente habíamos demostrado que tiene capacidad para procesar a TrkB-T1 (**Fig. R25B**). Para ello, los cultivos celulares fueron transducidos como anteriormente con LV-HA-TrkB-T1-GFP y, transcurridos 6 días, su medio extracelular sustituido por medio condicionado de cultivos no infectados llevados en paralelo y, posteriormente, sometidos a condiciones excitotóxicas por 4 o 6 h (**Fig. R26C**). El análisis con el anticuerpo HA del medio de cultivo recogido al finalizar el tratamiento con NMDA demostró la liberación específica de un fragmento extracelular TrkB-T1 en las neuronas expuestas a NMDA, similar al anteriormente descrito para la isoforma TrkB-FL (f74). La aparición y acu-

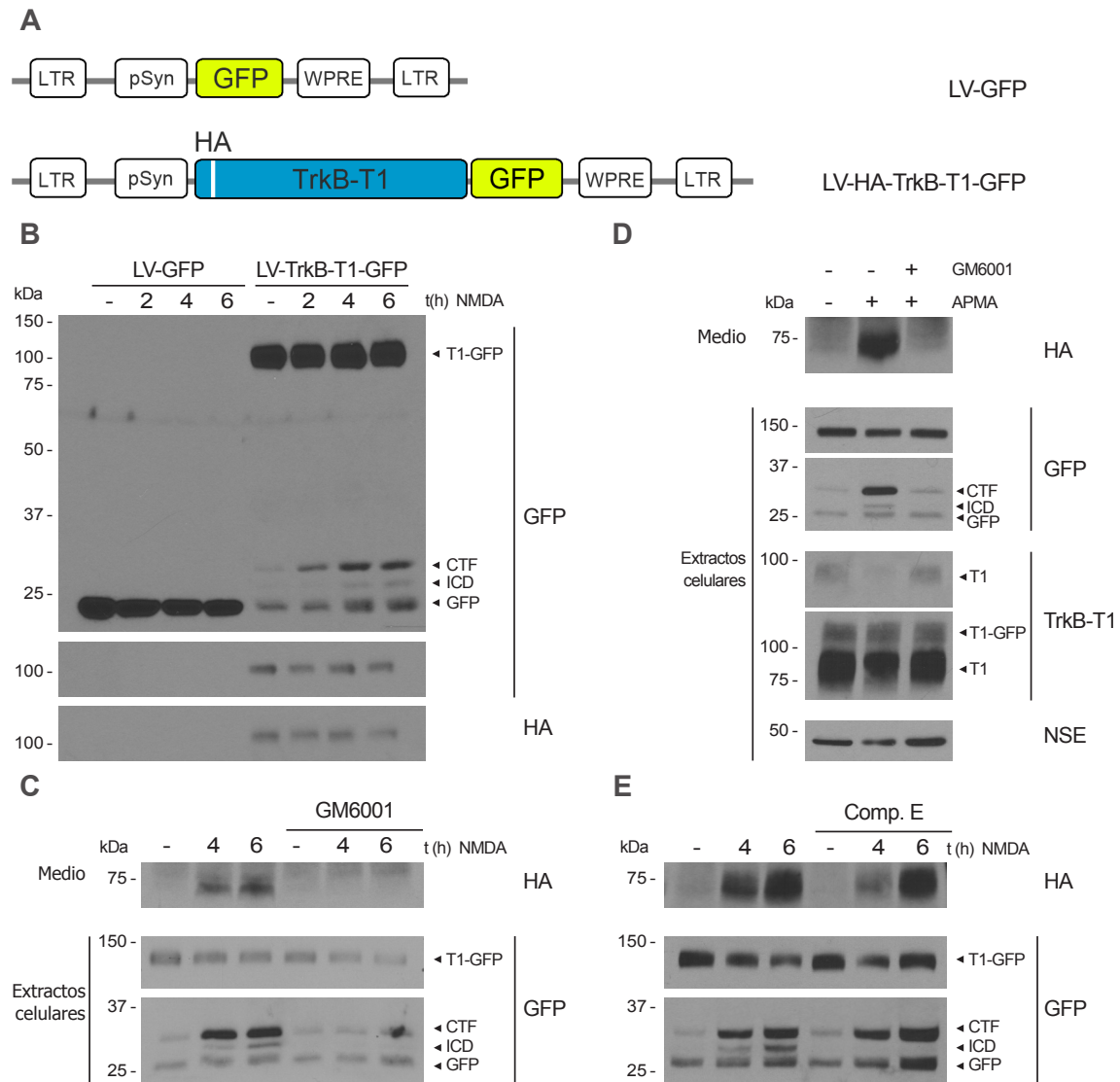


Figura R26. Procesamiento de TrkB-T1 por metalproteinasas y γ -secretasas en excitotoxicidad. **A**, Esquema de los vectores lentivirales LV-GFP y LV-HA-TrkB-T1-GFP que codifican respectivamente GFP y el receptor de fusión HA-TrkB-T1-GFP de manera neuroespecífica. **B**, Análisis por WB de las proteínas recombinantes expresadas en cultivos primarios infectados con LV-GFP o LV-HA-TrkB-T1-GFP e incubados con NMDA por diferentes periodos de tiempo. **C**, **D** y **E**, Estudio mediante WB del receptor de fusión y sus fragmentos resultantes en cultivos neuronales infectados con LV-HA-TrkB-T1-GFP preincubados con GM6001 (10 μ M, **C** y **D**) o *Compound E* (10 μ M, **E**) durante 30 min y posteriormente por 4-6 h con NMDA (**C** y **E**) o 6 h con APMA (**D**) según se indica. Los medios de cultivo fueron sustituidos al inicio de los tratamientos por medios condicionado procedentes de cultivos realizados en paralelo pero no infectados.

mulación de este fragmento en el medio extracelular se producía de manera simultánea con la formación de los fragmentos intracelulares previamente descritos en los extractos celulares. La generación tanto del ectodominio como de los fragmentos C-terminales de HA-TrkB-T1-GFP en respuesta al tratamiento con NMDA era completamente prevenida en cultivos pre-incubados durante 30 min con el inhibidor de metaloproteinasas GM6001 (**Fig. R26C**). Adicionalmente,

cultivos celulares realizados en paralelo e incubados con APMA durante 6 h confirmaron la acción de las metaloproteinasas sobre el receptor TrkB-T1 recombinante, ya que la activación de esta proteasa dio lugar a la liberación del ectodominio y la producción de los fragmentos intracelulares descritos anteriormente (**Fig. R26D**). Como era de esperar, el procesamiento de HA-TrkB-T1-GFP inducido por APMA fue igualmente bloqueado por inhibidores específicos de estas proteasas. Al mismo tiempo, el tratamiento con APMA fue nuevamente capaz de reducir los niveles de la isoforma TrkB-T1 endógena, detectada con un anticuerpo isoforma-específico y distinguible de la forma recombinante HA-TrkB-T1-GFP por su diferente movilidad electroforética. Finalmente, al igual que hicimos anteriormente para TrkB-FL, exploramos la hipótesis de una actuación conjunta de γ -secretasas y metaloproteinasas en el procesamiento de la isoforma TrkB-T1 de este receptor. Para ello, cultivos de 13 DIVs, previamente infectados con LV-HA-TrkB-T1-GFP como anteriormente, se incubaron con el inhibidor *Compound E* por 30 min y, posteriormente, con NMDA durante 4 o 6 h. La inhibición de las γ -secretasas en las condiciones de excitotoxicidad consiguió bloquear la aparición del fragmento C-terminal de 30 kDa, sin alterar la producción del ectodominio ni del fragmento de 34 kDa (**Fig. R26E**). Este resultado permite sugerir que la proteína TrkB-T1 es procesada en regiones intramembrana por las γ -secretasas, dando lugar a una proteína de fusión de 30 kDa que correspondería con el ICD de la isoforma unido a GFP. Adicionalmente, el conjunto de estos resultados también indica que el fragmento de 34 kDa es el producto de la acción de metaloproteinasas y corresponde al CTF de TrkB-T1 unido a GFP, susceptible de procesamiento subsiguiente por γ -secretasas para producir el fragmento de 30 kDa. Hay que resaltar que la acción de las γ -secretasas sobre sus sustratos parece requerir únicamente su proteólisis previa por metaloproteinasas (Hemming et al., 2008, Funamoto et al., 2013). Esta propiedad permite entender los resultados de los experimentos donde se indujo la activación de metaloproteinasas por su activador específico APMA, que dieron lugar a la formación del CTF pero también del ICD (**Fig. R26D**), o aquellos en los que se inhibió específicamente su activación, con el resultado de un bloqueo en la formación de CTF pero también ICD (**Fig. R26C y D**). Por el contrario, la inhibición de las γ -secretasas no tuvo un efecto sobre la actividad de las metaloproteinasas (**Fig. R26E**).

En conjunto, estos resultados nos indican que el receptor TrkB-T1 presente en neuronas podría ser inicialmente procesado en la región yuxtamembrana por la activación de metaloproteinasas en excitotoxicidad, liberando su ectodominio al medio extracelular y generando un fragmento CTF anclado en la membrana. Posteriormente, tendría lugar un mecanismo subordinado al primero, en el que las γ -secretasas procesarían el CTF en sus regiones intramembrana liberando el ICD de TrkB-T1 al citosol. A pesar de que el procesamiento llevado a cabo por estas dos proteasas sobre la isoforma TrkB-T1 sería un componente cuantitativamente minoritario de su regulación en procesos de excitotoxicidad *in vitro*, su importancia relativa podría ser diferente *in vivo* (**Fig. R4C**). Adicionalmente, los fragmentos de TrkB-T1 generados por estos procesos de RIP podrían tener una contribución muy importante en el proceso de muerte celular inducido en condiciones de excitotoxicidad.

7. Estrategia neuroprotectora dirigida a contrarestar los efectos del aumento de los niveles de TrkB-T1 en condiciones de excitotoxicidad

Como se ha mencionado anteriormente, la inducción de excitotoxicidad *in vitro* produce globalmente un aumento en los niveles neuronales de la isoforma TrkB-T1 (Vidaurre et al., 2012) y, por tanto, la neutralización de sus efectos sería una estrategia de neuroprotección interesante de explorar. Probablemente, los efectos negativos del incremento de TrkB-T1 derivan de su función como dominante negativo de TrkB-FL y de la activación exacerbada de vías de señalización propias de esta isoforma truncada, relacionadas mayoritariamente con el control de la morfología celular (revisado en Fenner, 2012). Una de las pocas proteínas conocidas que se ha establecido como capaz de interactuar en astrocitos con la secuencia de 11 aminoácidos específica de la isoforma TrkB-T1 es RhoGDI, un regulador negativo de proteínas Rho GTPasas como RhoA (Ohira et al., 2005). En condiciones de excitotoxicidad, la actividad de estas Rho GTPasas induce rutas de señalización relacionadas con la muerte celular y su inhibición es neuroprotectora (Jeon et al., 2013). Como hipótesis de trabajo nos planteamos que un mecanismo que podría explicar la activación de las Rho GTPasas en excitotoxicidad sería el incremento en los niveles de TrkB-T1 ya que, en caso de existir una interacción similar TrkB-T1/RhoGDI en neuronas, la isoforma secuestraría más proteína RhoGDI e impediría su acción inhibitoria sobre las Rho GTPasas. Por tanto, la interferencia de la interacción TrkB-T1/RhoGDI mediante péptidos que contuviesen las secuencias específicas de TrkB-T1 podría ejercer un efecto neuroprotector en condiciones patológicas.

Para investigar esta hipótesis, recurrimos nuevamente a la transducción proteica y diseñamos un péptido permeable con el dominio básico de la proteína transactivadora Tat del VIH, fusionado en esta ocasión con los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 (residuos 466-476, TT1; **Fig. R27A**). Un estudio anterior había demostrado que un péptido constituido por estos mismos 11 aminoácidos era capaz de prevenir *in vitro* la interacción entre TrkB-T1 y RhoGDI de manera eficiente (Ohira et al., 2005). Por tanto, su unión al dominio Tat permitiría su entrada al interior celular y su posterior acción interferente sobre la interacción de estas dos proteínas. A continuación, confirmamos mediante microscopía confocal la permeabilidad de este péptido a la membrana plasmática neuronal, incubando durante 3 h cultivos primarios de neuronas corticales diferenciadas durante 13 DIVs con TT1 (5 μ M) marcado con FITC (**Fig. R27B**). Observamos que, en estas condiciones, TT1 era capaz de introducirse en las neuronas presentes en los cultivos (**Fig. R27B**, flechas), detectadas por inmunofluorescencia con un anticuerpo específico (NeuN). Este péptido también podría ser reconocido por el anticuerpo isoforma-específico de TrkB-T1, por lo que realizamos experimentos de inmunofluorescencia en los que disminuimos la señal proporcionada por el receptor endógeno hasta hacerla indetectable, utilizando cultivos control que no habían sido incubados con péptido (**Fig. R27C**). Por tanto, en los cultivos tra-

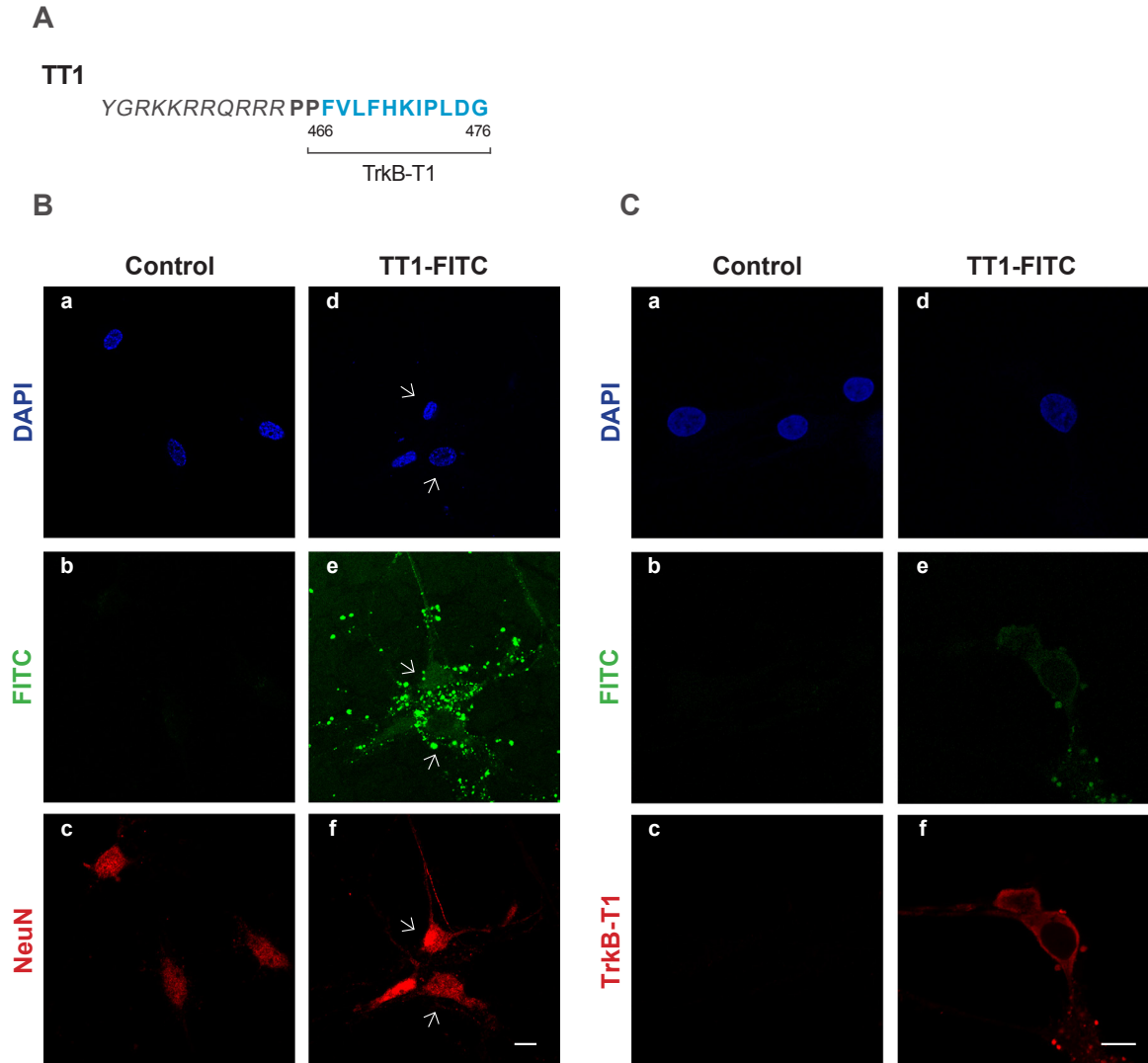


Figura R27. Péptido TT1 y su permeabilidad del péptido en neuronas. **A**, Representación de la secuencia aminoacídica de TT1, constituido por el dominio de transactivación Tat (en cursiva) y la secuencia C-terminal específica de TrkB-T1 (en azul). **B** y **C**, Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal a partir de cultivos primarios incubados durante 3 h con el péptido TT1 (5 μ M) marcado con FITC (**d-f**) respecto cultivos que no recibieron ningún péptido (**a-c**). Las células fijadas y permeabilizadas se analizaron mediante inmunofluorescencia con DAPI y anticuerpos que detectan NeuN (**B**, **c** y **f**) o la región específica de TrkB-T1 (**C**, **c** y **f**). En este último caso, las imágenes se obtuvieron reduciendo la señal captada en los cultivos controles hasta hacerla indetectable (**C**, **c**), con el fin de visualizar la fluorescencia en exceso procedente del péptido TT1, también reconocido por el anticuerpo (**C**, **f**). Barra de escala: 10 μ m.

tados con TT1-FITC, la fluorescencia acoplada al anticuerpo TrkB-T1 correspondería al péptido presente en el interior celular que, como cabía esperar, colocalizaba con la señal de FITC.

En principio, el péptido TT1 sólo debería actuar sobre las vías de señalización asociadas a la proteína TrkB-T1 pero quisimos comprobar si su presencia podría alterar el desbalance TrkB-FL/TrkB-T1 inducido por la sobreactivación del NMDAR. Para ello, los cultivos primarios fueron preincubados durante 30 min con los péptidos TMyc o TT1 (5 μ M) y tratados

seguidamente con NMDA durante tiempos variables (30-120 min) en presencia de los mismos, comparando los resultados con los de células no tratadas con NMDA pero sí péptido (**Fig. R28A**). El análisis con panTrkB mostró en ambos casos la esperada reducción en los niveles de TrkB-FL y un aumento de las formas truncadas (tTrkB), que corresponden a fragmentos producidos por el procesamiento de TrkB-FL y a TrkB-T1. La cuantificación de los niveles de TrkB-FL en tres experimentos independientes mostró que la disminución de la isoforma inducida por el tratamiento con NMDA no presentaba diferencias significativas entre los cultivos incubados con TMyC o TT1 (**Fig. R28B**). Asimismo, comprobamos que TT1 tampoco tenía efecto sobre la regulación excitotóxica de las isoformas de TrkB inducida por tratamientos más prolongados con NMDA (4 h), incluso utilizando concentraciones más elevadas de péptido (5, 15 y 25 μ M) (**Fig. R28C**). Adicionalmente, en estos experimentos, la presencia del péptido TT1 tampoco alteró el proceso de inactivación del factor de transcripción prosupervivencia CREB inducido en condiciones de excitotoxicidad en presencia del péptido control TMyC (**Fig. R28A y C**). Por tanto, la presencia del péptido TT1 no impide el aumento en los niveles de la isoforma TrkB-T1 inducido por las condiciones de excitotoxicidad, ni tampoco la disminución en los de TrkB-FL ni la inhibición de las rutas de señalización dependientes de esta isoforma.

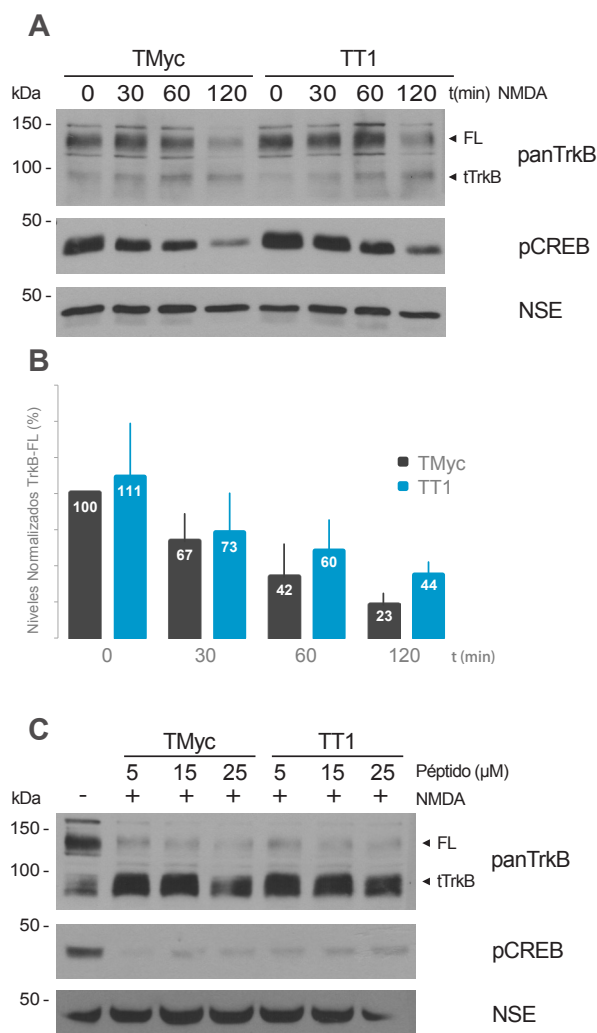


Figura R28. Regulación de TrkB en presencia de TT1 bajo condiciones excitotóxicas. **A**, Análisis por WB de las isoformas de TrkB y pCREB en cultivos primarios neuronales preincubados con TMyC o TT1 (5 μ M) durante 30 min y tratados posteriormente con diferentes tiempos de NMDA según se indica. **B**, Cinética de procesamiento de TrkB-FL en excitotoxicidad en presencia de TT1 o TMyC analizada mediante la cuantificación densitométrica de sus niveles normalizados. La representación gráfica indica los valores medios \pm s.e.m. (n=3) expresados en porcentaje respecto los datos obtenidos en los cultivos incubados con TMyC pero sin estimular con NMDA (100%). **C**, Estudio por WB del efecto de la dosis de TMyC o TT1 (5, 15 o 25 μ M) sobre los niveles de TrkB y pCREB en cultivos neuronales sometidos a excitotoxicidad durante 4 h.

A continuación, quisimos analizar si el péptido TT1 era capaz de interferir la interacción entre RhoGDI y el receptor TrkB-T1 en nuestro modelo celular. Para ello, estudiamos la asociación entre estas dos proteínas en cultivos primarios incubados durante 16 h con TMyc o TT1 (15 μ M) mediante ensayos de co-inmunoprecipitación con un anticuerpo que reconoce RhoGDI (**Fig. R29A**). Pudimos comprobar que esta asociación se llegaba a producir aunque de manera muy sutil, posiblemente porque sólo una pequeña fracción de la proteína RhoGDI participe en ella. En astrocitos se ha estimado que sólo un 2.2% del total de RhoGDI se encuentra asociada a TrkB-T1, mientras que un 44% del total de esta última interacciona con RhoGDI (Ohira et al., 2005). No obstante, el péptido TT1 lograba reducir eficientemente la co-inmunoprecipitación de TrkB-T1 con RhoGDI, aunque aún falta por esclarecer si esta interferencia se producía en la subpoblación neuronal presente en los cultivos mixtos o solo en astrocitos.

Seguidamente investigamos si, aun produciéndose el incremento en los niveles de TrkB-T1, la interferencia de sus interacciones específicas mediante el péptido TT1 era capaz de reducir la muerte neuronal inducida por excitotoxicidad. Para ello, los cultivos primarios fueron preincubados durante 30 min con diferentes concentraciones de los péptidos TMyc y TT1 (5, 15 y 25 μ M), y tratados a continuación con NMDA durante 4 h para inducir el proceso de excitotoxicidad (**Fig. R29B**). También caracterizamos un posible efecto tóxico de los péptidos por sí mismos, mediante el tratamiento de los cultivos durante 4 h y 30 min con iguales concentraciones de TMyc y TT1. Los datos obtenidos en 6 experimentos independientes mostraron que los cultivos tratados con TT1 a 5 μ M presentaban una viabilidad neuronal significativamente mayor ($37 \pm 5\%$, $p < 0.05$) respecto a los incubados con el péptido control ($21 \pm 4\%$). La neuroprotección proporcionada por TT1 era todavía más marcada a la concentración de 15 μ M, cuando la viabilidad neuronal de los cultivos incubados con TT1 fue tres veces mayor que la de aquellos tratados con TMyc ($46 \pm 4\%$ versus $13 \pm 4\%$, $p < 0.01$). Para ambas concentraciones de péptidos no se observaron efectos basales sobre la viabilidad neuronal en cultivos no tratados con NMDA. Sin embargo, a diferencia de TMyc, una dosis elevada de TT1 (25 μ M) fue capaz de inducir específicamente muerte neuronal de manera muy notable incluso en cultivos no sometidos a excitotoxicidad. Estos resultados nos indican que la inhibición mediante el péptido TT1 de la interacción entre el extremo C-terminal de TrkB-T1 y las proteínas que se asocian a esta región específica tiene, en principio, un efecto protector en condiciones de excitotoxicidad. Sin embargo, concentraciones elevadas de este péptido podrían resultar tóxicas para las neuronas si, por ejemplo, el bloqueo completo de determinadas vías de señalización ligadas a TrkB-T1 pudiera tener efectos deletéreos o si el péptido puede ejercer algún tipo de función por sí mismo. De cualquier modo, estos resultados sugieren que las rutas de señalización desencadenadas por TrkB-T1 ejercen un papel esencial en la neurona y que la alteración de su regulación en situaciones patológicas como la excitotoxicidad juega probablemente un papel esencial en la muerte neuronal.

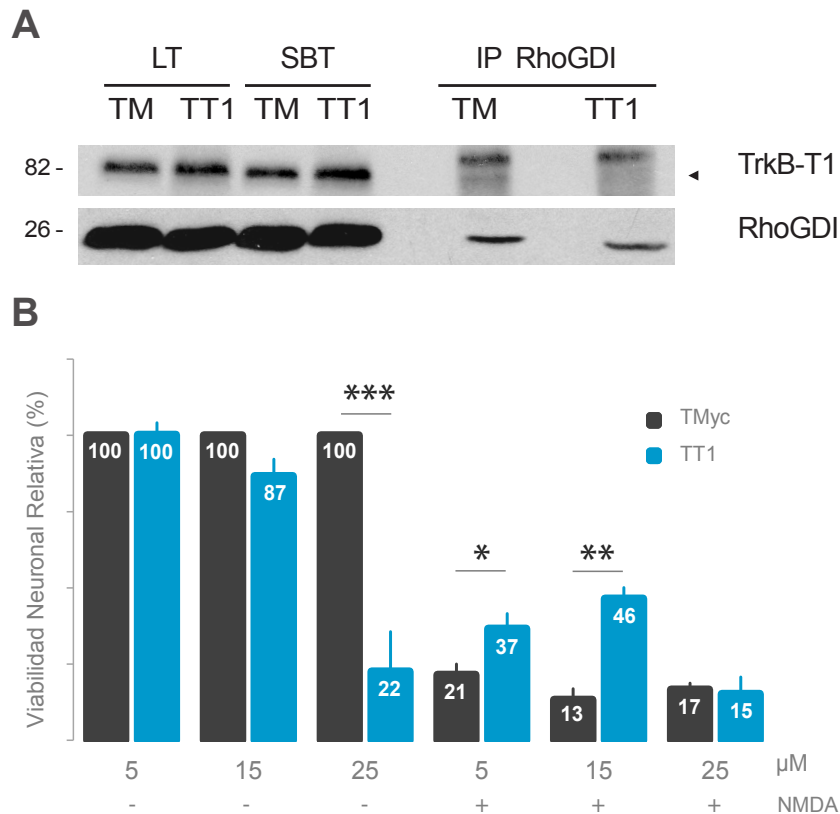


Figura R29. Evaluación de la capacidad interferente de TT1 y su efecto neuroprotector en excitotoxicidad. **A**, Extractos celulares procedentes de cultivos neuronales incubados durante 16 h con TMyC o TT1 (15 μM) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo que reconoce específicamente a RhoGDI. Posteriormente fue analizada la presencia de TrkB-T1 (indicada con punta de flecha) y RhoGDI mediante WB en los lisados totales (LT), las muestras inmunoprecipitadas (IP) y el sobrenadante obtenido tras la inmunoprecipitación (SBT). **B**, Viabilidad neuronal de cultivos preincubados con TMyC o TT1 (5, 15, 25 μM) y posteriormente tratados con NMDA durante 4 h según se muestra. La gráfica representa los valores medios \pm s.e.m. (n=6) expresados en porcentaje respecto los obtenidos en cultivos tratados con una concentración equivalente de TMyC pero no NMDA (100%). Los cálculos estadísticos se realizaron con el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann Whitney (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

8. Evaluación del efecto neuroprotector de los péptidos TT1 y TFL₄₅₇ en un modelo de isquemia cerebral focal

Nuestro siguiente objetivo consistió en analizar *in vivo* el efecto de los péptidos que habían demostrado capacidad neuroprotectora en los cultivos primarios sometidos a excitotoxicidad, haciendo uso del modelo murino de isquemia cerebral por fototrombosis previamente descrito. En primer lugar, testamos el efecto de TT1 comparándolo con el péptido control TMyC, como control negativo, o con NA-1, como un control positivo. Éste es un péptido que interfiere la interacción entre la subunidad GluN2B del NMDAR y su proteína interaccionante PSD95 y

cuya acción atenúa el volumen del infarto cerebral en diferentes modelos animales de isquemia (Aarts et al., 2002, Cook et al., 2012). Los diferentes péptidos (10 mg/kg) fueron administrados intraperitonealmente 30 min después del inicio del daño isquémico y los animales fueron sacrificados tras 24 h (**Fig. R30A**). Este esquema de administración, de gran relevancia clínica, tendría la ventaja de que la entrada de los péptidos en las neuronas sería facilitada por la activación del proceso de excitotoxicidad, tal como se demostró anteriormente (Vaslin et al., 2011). Sin embargo, la rapidez de la oclusión microvascular dificultaría el acceso de los péptidos a la región cerebral afectada, que tendría que ocurrir por flujo colateral. El análisis del volumen de los infartos obtenidos de esta manera, visualizados mediante la tinción de las rodajas de cerebro con el colorante vital TTC, mostró valores comprendidos entre el 2.5 y 5 % del hemisferio cerebral y no evidenció diferencias significativas entre los distintos grupos de ratones (**Fig. R30A**).

Como consecuencia de los resultados obtenidos anteriormente, en un segundo experimento decidimos estudiar el efecto de TFL₄₅₇ *in vivo*, péptido que también tenía una elevada capacidad neuroprotectora *in vitro*, realizando una serie de modificaciones en el método de inducción de isquemia cerebral. El objetivo fue optimizar la reproducibilidad del modelo y facilitar la detección de posibles efectos neuroprotectores. Como se indicó, utilizamos una línea consanguínea de ratón, incrementamos el diámetro del haz de luz para aumentar el tamaño de la lesión y poder distinguir

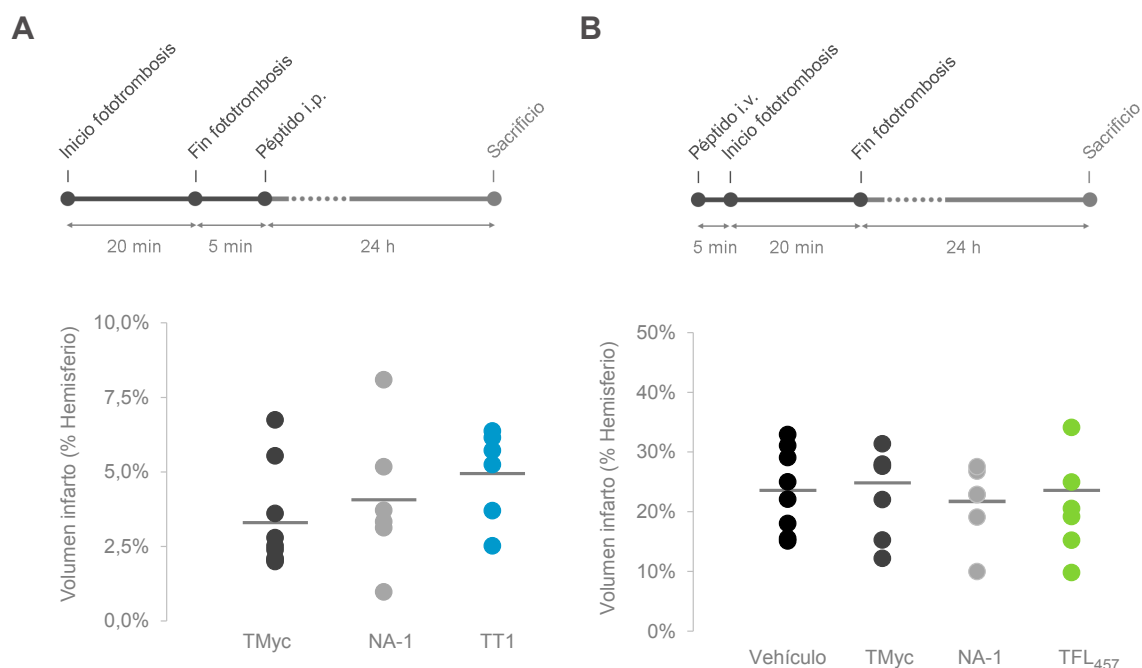


Figura R30. Análisis del efecto neuroprotector de TT1 y TFL₄₅₇ en un modelo de isquemia cerebral permanente. Ratones de 8 semanas fueron sometidos a un procedimiento de isquemia cerebral focal por fototrombosis y se les administró i.p. con los péptidos TMyc, NA-1 o TT1 (10 mg/kg, n=6) (**A**) o i.v. con TMyc, NA-1, TFL₄₅₇ (10 mg/kg, n=8) o su vehículo (**B**). El sacrificio se realizó 24 h después, y se evaluó el tamaño del infarto mediante tinciones con el colorante vital TTC. En la parte superior se indica el esquema del procedimiento realizado y en la inferior la cuantificación del volumen del infarto expresado en porcentaje respecto al total del hemisferio.

mejor las posibles variaciones, y administramos el compuesto fotosensible por vía intravenosa con el fin de mejorar la reproducibilidad del método (Dirnagl, 2010). Adicionalmente, la administración de los diferentes péptidos (TMyc, TFL₄₅₇ o NA-1) o su vehículo se realizó a través del seno venoso retro-orbital 5 min antes del comienzo de la inducción de la isquemia cerebral (**Fig. R30B**). Este esquema experimental, de menor interés clínico, trataba de aprovechar la rápida difusión de estos péptidos (Davoli et al., 2014) para facilitar su presencia en el tejido cerebral previamente a la inducción de la lesión. Sin embargo, al igual que en la ocasión anterior, el volumen del infarto producido fue muy similar en todos los grupos de animales estudiados (**Fig. R30B**).

A la vista de estos resultados, podemos concluir que en las condiciones experimentales utilizadas los péptidos TT1 y TFL₄₅₇ no son capaces de disminuir el tamaño del infarto en un modelo de isquemia cerebral permanente. No obstante, llama la atención que el péptido NA-1 tampoco fuese capaz de ejercer ningún efecto neuroprotector a pesar de haberse demostrado su eficacia con dosis equiparables en modelos de isquemia transitoria (tMCAO) (Aarts et al., 2002, Sun et al., 2008) o incluso permanente (pMCAO y oclusión de vasos piales, PVO) (Sun et al., 2008, Bell et al., 2013). Es importante resaltar que, en ensayos de excitotoxicidad *in vitro*, hemos podido reproducir el efecto neuroprotector de NA-1, si bien utilizando concentraciones de péptido muy superiores a las anteriormente reportadas (Aarts et al., 2002). Un factor crítico podría ser el grado de pureza de los péptidos utilizados o su estabilidad, elemento que podría ser clave particularmente en los experimentos *in vivo*, por lo que exploraremos la introducción de modificaciones en los mismos para hacerlos más estables. Además de evaluar estos factores, otra posibilidad que debemos considerar es que estos resultados se deban a la severidad del modelo utilizado, donde la rapidez de la progresión del infarto y el considerable edema vasogénico producido podrían limitar la ventana terapéutica a un corto periodo de tiempo (Dirnagl, 2010).

9. Investigación de posibles biomarcadores de daño neuronal basados en el procesamiento de TrkB inducido en condiciones de excitotoxicidad

A lo largo de este trabajo hemos comprobado que condiciones patológicas como la excitotoxicidad inducen la acción de diversos sistemas proteolíticos sobre el receptor de neurotrofinas TrkB, originando fragmentos de diverso tamaño. Cuantitativamente, el procesamiento más importante es el derivado de calpaína, proteasa que actúa sobre la isoforma completa de TrkB dando lugar a un polipéptido intracelular de unos 32 kDa que se acumula abundantemente y permanece relativamente estable incluso 24 h después de la inducción de la lesión en un modelo animal de isquemia cerebral (**Fig. R5A y B**). Asimismo, los receptores TrkB también son susceptibles de procesamiento en su región extracelular por metaloproteinasas en modelos celulares de excitotoxicidad, lo que libera su ectodominio al medio (f74) (**Fig. R22**). Además, este mecanismo también parece producirse *in vivo* tras un ictus isquémico, tal y como demuestra la presencia del CTF

de TrkB-FL (f42) en las regiones lesionadas de ratones sometidos a isquemia cerebral permanente (**Fig. R5B**). En el caso de que estos fragmentos del receptor TrkB fuesen capaces de difundir a la sangre o el LCR en los animales modelo desde tiempos tempranos tras el daño cerebral, podrían constituir nuevos biomarcadores para el ictus mediante su detección en los pacientes.

De manera preliminar, investigamos la presencia de f32 en el suero de ratones sometidos a isquemia cerebral permanente obtenido 24 h tras el inicio de la lesión. De manera conjunta, analizamos suero de ratas que habían sufrido una oclusión transitoria de la ACM seguida por 24 h de reperusión. En ambos casos, estas muestras fueron comparadas con sueros de animales *sham-operated* (**Fig. R31A**). Paralelamente, también analizamos el suero de un paciente de ictus extraído en el momento de su ingreso en el hospital, correspondiente a menos de 4.5 h desde el comienzo de los síntomas y justo antes de iniciar terapia trombolítica con rTPA, y lo comparamos con el obtenido a las 24 h de iniciado el tratamiento. En todos los casos, el exceso de albúmina y otras proteínas abundantes del suero se redujo como se indicó anteriormente. El análisis de WB con el anticuerpo TrkB-FL Ct permitió observar un fragmento con una movilidad relativa de unos 32 kDa que aparecía de manera más notable en el suero de animales que habían sufrido isquemia cerebral y en el paciente humano a las 24 h del ingreso. No obstante, a pesar de una eliminación parcial de las proteínas más abundantes del suero, el patrón de bandas que eran detectadas por este anticuerpo era muy abundante, por lo que esta señal podría ser un mero artefacto. En consecuencia, decidimos utilizar este mismo anticuerpo unido covalentemente a proteína A-sefarosa

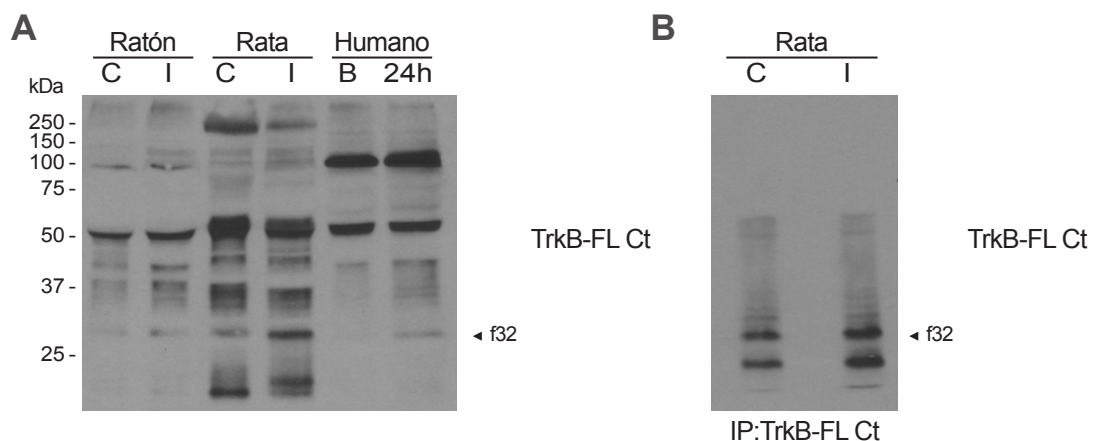


Figura R31. Fragmentos C-terminales de TrkB-FL presentes en suero como posibles biomarcadores de isquemia cerebral. **A**, Análisis por WB de los posibles fragmentos de TrkB-FL difundidos a sueros obtenidos 24 h después de la inducción de isquemia cerebral (I) por fototrombosis en ratón o por oclusión de la ACM en rata comparados con sueros procedentes de animales controles *sham-operated* (C). Paralelamente, se evalúa los sueros de un paciente que ha sufrido un infarto cerebral obtenido inmediatamente tras su ingreso en el hospital (B, <4.5 h desde el inicio del infarto), o bien, transcurridas 24 h de la primera extracción de sangre (24h). **B**, Inmunoprecipitación (IP) y análisis por WB de los fragmentos de TrkB-FL en los sueros de rata mostrados anteriormente, utilizando el anticuerpo que reconoce específicamente su región C-terminal.

para inmunoprecipitar específicamente la proteína TrkB-FL o sus fragmentos en las muestras de suero de rata (**Fig. R31B**). De esta manera comprobamos que el fragmento de 32 kDa, producido por la acción de calpaína, es capaz de difundir a la sangre tras el daño isquémico y ser detectado.

Adicionalmente, estudiamos LCRs procedentes de ratas sometidas a isquemia cerebral mediante la oclusión de la ACM con el fin de detectar los posibles fragmentos de TrkB. Las muestras fueron obtenidas 2 h después del inicio de la lesión (post) y comparadas con LCR del mismo animal extraído alrededor de una semana antes de la operación (pre). Asimismo, también se evaluaron las muestras de animales *sham-operated*. El análisis mediante WB utilizando el anticuerpo panTrkB, demostró la aparición de un fragmento de unos 66 kDa después de la inducción de la isquemia cerebral (**Fig. R32A**). La cuantificación de sus niveles ($n=4$) permitió comprobar que el incremento producido era de hasta 8 ± 1 respecto a las muestras del mismo animal extraídas previamente al daño isquémico, y significativamente superiores respecto a los valores obtenidos en los *sham-operated* ($p<0.01$) (**Fig. R32B**). Por el contrario, utilizando el anticuerpo TrkB-FL Ct no observamos la presencia de f32, posiblemente debido a que las muestras fueron tomadas a tiempos tempranos tras la isquemia cerebral mientras que la difusión de este fragmento pudiera requerir tiempos más prolongados y la lisis celular. El fragmento de 66 kDa detectado en el LCR es de menor tamaño al observado previamente en los cultivos celulares (f74), lo que podría indicar que el ectodominio de TrkB es susceptible de sufrir procesamiento posterior tras su liberación al medio extracelular, por ejemplo por MMP-9, tal y como se ha demostrado en otras patologías (Navaratna et al., 2013).

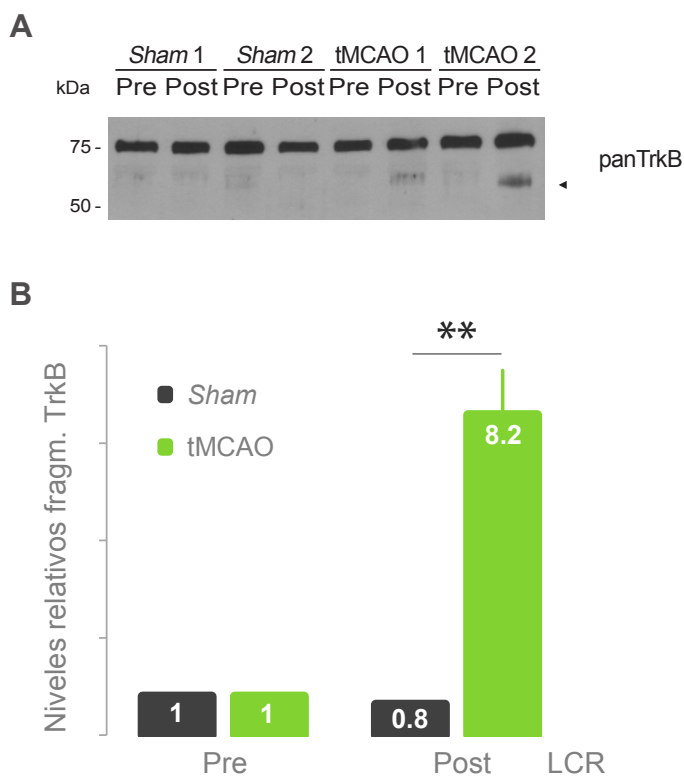


Figura R32. Fragmentos de TrkB presentes en LCR como posibles biomarcadores de isquemia cerebral. **A**, Estudio mediante WB con el anticuerpo panTrkB de LCRs procedentes de ratas sometidas a la oclusión de la ACM obtenidos alrededor de una semana antes de la operación (Pre) y 2 h después del inicio de la lesión (Post), comparados con muestras extraídas de animales controles sham-operated. Se indica con punta de flecha un fragmento de unos 66 kDa de TrkB. **B**, Cuantificación densitométrica de los niveles del fragmento anteriormente detectado. Se representan el valor promedio \pm s.e.m. ($n=4$) tomando como referencia los niveles detectados en los LCRs obtenidos antes de la operación, a los que se asignó un valor arbitrario de 1. El análisis estadístico se realizó mediante el test de la t de Student desapareada (** $p<0.01$).

En cualquier caso, estos resultados indican que un fragmento extracelular de TrkB producido en excitotoxicidad puede difundir al LCR y detectarse tempranamente tras el daño isquémico.

Estos datos preliminares ponen de manifiesto el potencial de los fragmentos de TrkB como biomarcadores de la isquemia cerebral y, una vez establecida su cinética de producción y difusión a la sangre y al LCR, podrían proporcionar información adicional a las pruebas diagnósticas actuales, mejorando su sensibilidad y especificidad.

DISCUSIÓN

1. Mecanismos de regulación de los receptores de neurotrofinas TrkB en excitotoxicidad e isquemia cerebral

En los procesos de isquemia cerebral se produce un desbalance entre isoformas TrkB-FL/TrkB-T1, que ha sido demostrado tanto en modelos animales (Ferrer et al., 2001, Gomes et al., 2012, Vidaurre et al., 2012) como en pacientes humanos (Vidaurre et al., 2012). En un trabajo previo, nuestro grupo estableció que esta desregulación se produce como consecuencia de mecanismos desencadenados por la excitotoxicidad que tiene lugar tras el daño isquémico. Éstos consisten en una regulación transcripcional inversa, que favorece la expresión de la isoforma TrkB-T1, y en el procesamiento de TrkB-FL por la acción proteolítica de calpaína (Vidaurre et al., 2012), resultados que fueron posteriormente corroborados por el grupo de Gomes et al. (2012). En el presente estudio, hemos profundizado en la caracterización del procesamiento de TrkB-FL, analizando los fragmentos resultantes de la actividad de esta proteasa sobre el receptor de neurotrofinas. Asimismo, el trabajo desarrollado en esta tesis ha permitido identificar mecanismos proteolíticos complementarios que actúan sobre ambas isoformas de TrkB en situaciones de excitotoxicidad e isquemia cerebral. El conjunto de todas estas alteraciones, como detallaremos seguidamente, revela un complejo escenario para la regulación de TrkB en condiciones patológicas que pone de manifiesto su importancia en la muerte neuronal excitotóxica y señala a estos receptores como diana terapéutica.

1.1 Acción proteolítica de calpaína sobre la isoforma TrkB-FL

La sobreexcitación de los NMDARs induce una activación en exceso de la proteasa calpaína (Hong et al., 1994) que, a su vez, actúa sobre TrkB-FL dando como resultado un receptor truncado de 95 kDa anclado en la membrana (Vidaurre et al., 2012) y un fragmento intracelular con una movilidad relativa de 32 kDa (f32) (esquemático en la **Fig. D1**). Anteriormente, nuestro laboratorio había identificado que el sitio de procesamiento de calpaína en esta isoforma se localizaba entre los residuos T648 y Q649 (Vidaurre, 2011). No obstante, los experimentos desarrollados en este trabajo, utilizando herramientas adicionales como el anticuerpo que reconoce específicamente la región C-terminal de TrkB-FL, han permitido sugerir que la secuencia diana de esta proteasa se sitúa en regiones más próximas al dominio transmembrana. Concretamente, en un estudio reciente, se ha demostrado que el procesamiento de TrkB-FL por calpaína se produce entre las posiciones aminoacídicas N520 y S521 (Jeronimo-Santos et al., 2014). Teniendo en cuenta estos datos, el receptor truncado resultante de esta proteólisis contendría el residuo Y515, importante para el anclaje de las proteínas adaptadoras que desencadenan la activación de las vías MAPK/ERK y PI3K, y sería tan sólo 16 aminoácidos más corto que la isoforma TrkB-Shc (Stoilov et al., 2002), expresada en humanos. En conse-

cuencia, el receptor TrkB-FL truncado podría cumplir acciones similares a las de TrkB-Shc, un dominante negativo que contribuye a la inhibición de las vías de señalización neurotróficas (Wong and Garner, 2012). Sin embargo, también podría tener funciones adicionales puesto que, a diferencia de TrkB-Shc que no es fosforilable, el receptor TrkB-FL truncado parece mantener la fosforilación en el residuo Y515 previa al procesamiento (datos no mostrados).

Por otra parte, el segundo producto de la acción de calpaína sobre TrkB-FL, f32, presenta alta estabilidad en un modelo de excitotoxicidad *in vitro*, como demuestra el incremento de sus niveles hasta al menos 6 h después de iniciado el tratamiento con NMDA. Además, los resultados de inmunocitoquímica sugieren que f32 se localiza principalmente en el soma de las neuronas. En un modelo murino de isquemia cerebral, donde el proceso de excitotoxicidad ocurre *in vivo*, los niveles de f32 son estables hasta 5 o 24 h después de la inducción de la lesión en función de la intensidad del daño. En condiciones basales, tanto *in vitro* como *in vivo*, también es posible detectar este fragmento, aunque a unos niveles muy inferiores o los observados tras la inducción de excitotoxicidad. Esto podría deberse a cierta actividad basal de calpaína o incluso corresponder con la pequeña fracción de muerte neuronal que puede ocurrir de forma normal en cultivos celulares o tejido vivo. En cualquier caso, la fuerte asociación entre la formación de f32 y la sobreactivación de los NMDARs, sumada a la estabilidad de este fragmento, la presencia en el mismo del dominio tirosina quinasa intacto y la persistencia de su fosforilación en el residuo Y816, responsable del anclaje y activación de PLC γ , permiten sugerir una función biológica para este fragmento en condiciones de excitotoxicidad. A este respecto, es interesante resaltar que otros miembros de la familia de receptores tirosina quinasa (RTKs) experimentan procesamientos similares, mediados por diversos sistemas enzimáticos, que generan fragmentos intracelulares capaces de promover diferentes funciones, como la apoptosis celular (revisado en Ancot et al., 2009). Este es el caso, por ejemplo, del receptor de neurotrofinas TrkC, proteína cuyo dominio tirosina quinasa tiene un 78.3 % de homología con el de TrkB (Bertrand et al., 2012), y que en ausencia de NT-3 es procesado por caspasas liberando un fragmento proapoptótico (Tauszig-Delamasure et al., 2007). La acción de este fragmento intracelular de TrkC junto con la pérdida de la señalización prosupervivencia mediada por la activación del receptor completo contribuyen a la muerte neuronal (Tauszig-Delamasure et al., 2007). El receptor TrkA es otro ejemplo de proteína RTK cuyo procesamiento, en este caso por la acción de metaloproteinasas, genera un dominio intracelular anclado en la membrana con funciones propias, ya que puede permanecer fosforilado y permitir la unión de proteínas interaccionantes como p85 p13K y PLC γ (Díaz-Rodríguez et al., 1999). En consecuencia, tanto f95 como f32 tienen altas probabilidades de tener alguna función en el interior celular y será

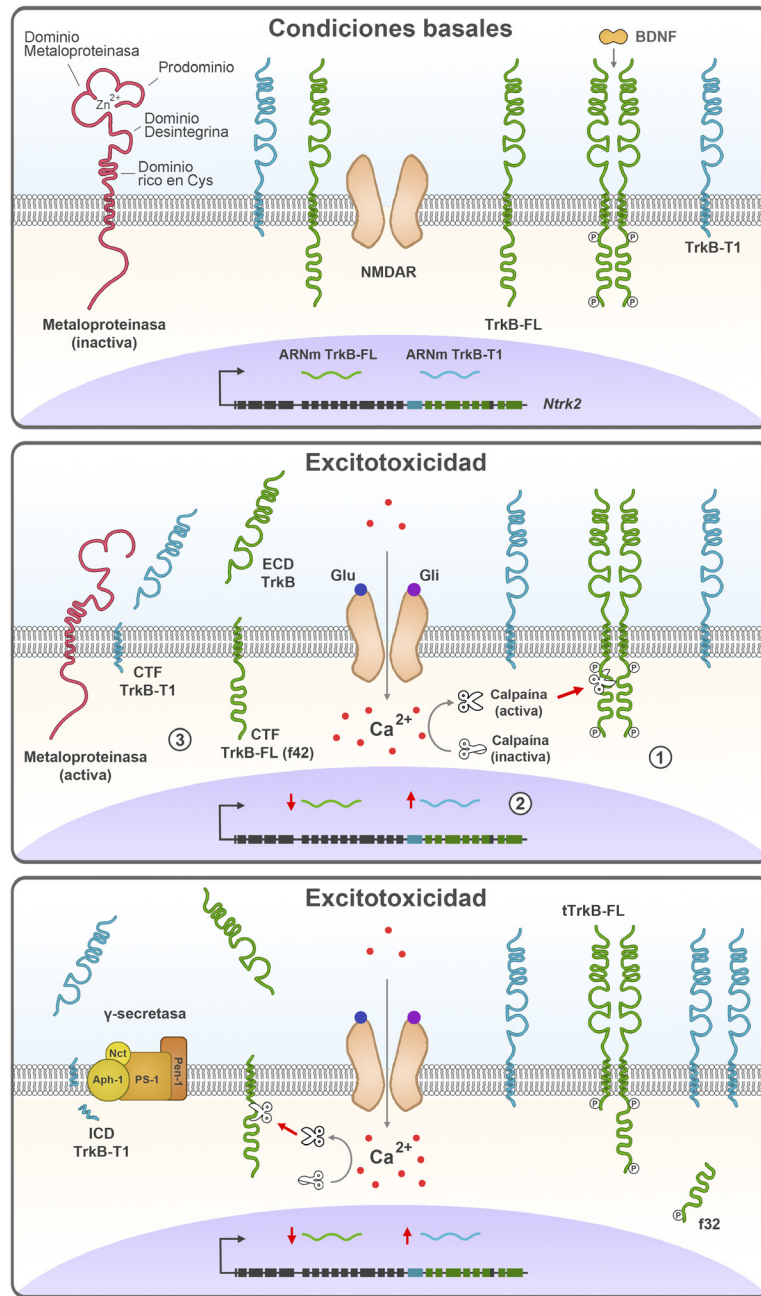


Figura D1. Modelo de la regulación del receptor TrkB en excitotoxicidad e isquemia cerebral. En primer lugar, el exceso de Ca^{2+} induce la activación de la proteasa calpaína (1) que procesa el receptor TrkB-FL entre las posición aminoacídicas 520 y 521, generando un fragmento intracelular de 32 kDa (f32) y un receptor truncado en la membrana de 95 kDa que podría actuar como dominante negativo. Por otra parte, las condiciones excitotóxicas invierten el patrón transcripcional del gen *Ntrk2* (2) lo que conlleva a un aumento en los niveles de la isoforma TrkB-T1 y una disminución de TrkB-FL. Finalmente, un tercer mecanismo, minoritario respecto los anteriores, consiste en el procesamiento por metaloproteinasas (3) sobre ambas isoformas de TrkB que conlleva la liberación de sus ectodominios al medio extracelular, los cuales podrían secuestrar el BDNF del medio reduciendo su disponibilidad. Además, como resultado de este procesamiento también se producen CTFs que permanecen anclados en la membrana. En el caso de TrkB-FL, este fragmento (f42) puede ser procesado ulteriormente por calpaína al contener su sitio de corte. Sin embargo, el CTF de TrkB-T1 sufre un procesamiento secuencial por γ -secretasas que liberan su ICD que podría ejercer alguna función en el interior celular.

interesante evaluar si contribuyen activamente a la muerte neuronal excitotóxica junto con la falta de señalización prosupervivencia derivada de la pérdida del receptor TrkB-FL completo.

1.2 Acción de metaloproteinasas y γ -secretasas sobre los receptores TrkB

Los datos mostrados en este trabajo evidencian que la regulación del receptor de neurotrofinas TrkB en condiciones de excitotoxicidad es mucho más compleja, activándose también un mecanismo independiente de calpaína, que actúa sobre su región extracelular provocando la liberación de un ectodominio al medio de cultivo (**Fig. D1**). El uso de activadores (APMA) e inhibidores específicos (TAPI-2 y GM6001) ha permitido demostrar que las enzimas responsables de este procesamiento pertenecen a la familia de las metaloproteinasas, que incluye a las MMPs y a las desintegrinas y metaloproteinasas (ADAMs) (revisado en Yong, 2005, Hartmann et al., 2013). La mayoría de las MMPs son liberadas al medio extracelular mientras que las ADAMs son proteínas integrales de membrana. Estas endopeptidasas dependientes de zinc son responsables de la degradación de componentes de la matriz, por lo que están implicadas en multitud de procesos fisiológicos como el crecimiento y la migración celular, pero también participan en procesos patológicos como la isquemia cerebral (Rosenberg, 2009). Además, las metaloproteinasas también pueden proteolizar proteínas de la superficie celular de forma similar a lo descrito para TrkB. Este tipo de sustratos incluyen factores de crecimiento, citoquinas, moléculas de adhesión, receptores y proteínas del sistema inmune (Huovila et al., 2005), e incluso otros integrantes de la familia de receptores de neurotrofinas como p75^{NTR} (DiStefano et al., 1993) y TrkA (Díaz-Rodríguez et al., 1999). En el caso de los RTKs, el procesamiento en la región yuxtamembrana y posterior desprendimiento del ectodominio es ejercida fundamentalmente por miembros de las ADAMs, en especial ADAM10 y ADAM17 (Saftig and Reiss, 2011). Un mismo RTK puede ser fragmentado por diversas metaloproteinasas, que pueden actuar dependiendo del tipo celular o del estímulo. Por ejemplo, se ha identificado que la proteólisis de p75^{NTR} y TrkA es realizada por ADAM17 en respuesta a ésteres de forbol (Díaz-Rodríguez et al., 2002, Weskamp et al., 2004), aunque TrkA puede ser procesada por metaloproteinasas diferentes no identificadas en presencia de otros estímulos como el estrés osmótico (Díaz-Rodríguez et al., 2002). Además, existen circuitos de regulación entre estas proteínas muy interesantes como, por ejemplo, la activación por fosforilación de ADAM17, dependiente de la función de receptores TrkA y TrkB, que facilita el procesamiento de p75^{NTR} lo que potencia, a su vez, la supervivencia neuronal mediada por los Trks (Kommaddi et al., 2011).

Recientemente, se ha publicado que el receptor TrkB es procesado por MMP-9 en el cerebro de ratas hiperglicémicas tratadas con estreptozotocina, modelo animal de diabetes, proceso mediado por el aumento de actividad de esta proteasa por las células del endotelio vascular (Navaratna et al., 2013). La inhibición de las funciones tróficas propias de TrkB en esas neuronas

explicaría la pérdida progresiva de neuroprotección endógena propia del cerebro diabético y su vulnerabilidad al daño. Este procesamiento de TrkB genera un fragmento N-terminal de unos 25 kDa que, de acuerdo a resultados de espectrometría de masas, contiene la secuencia aminoácídica 111-120 del receptor (Navaratna et al., 2013). Aunque, como veremos, no podemos descartar la participación de MMP-9 en la regulación de TrkB en los modelos animales de isquemia, el procesamiento mayoritario inducido por sobreactivación de los NMDARs en los modelos *in vitro* parece ser diferente. El fragmento extracelular de TrkB observado tiene una movilidad relativa de unos 74 kDa y puede ser detectado mediante anticuerpos que reconocen el epítipo HA, localizado tras el aminoácido 11 en los receptores recombinantes expresados de forma neuroespecífica con vectores lentivirales. Además, f74 también es reconocido por anticuerpos que tienen como epítipo las secuencias 156-340 de la región extracelular de TrkB, por lo que en el modelo celular el corte por metaloproteinasas no parece ocurrir en zonas próximas al extremo N-terminal sino cerca de la región transmembrana. Una proteasa que podría ser responsable de este procesamiento es ADAM10, ya que tanto la activación de los NMDARs (Suzuki et al., 2012) como el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Nagano et al., 2004, Guo et al., 2012) estimulan su actividad. Sin embargo, teniendo en cuenta las distintas evidencias que relacionan a MMP9 con el proceso isquémico (Koistinaho et al., 2005, Svedin et al., 2007, Rivera et al., 2010), no podemos excluir la participación de esta proteasa en la regulación de TrkB. De hecho, los resultados preliminares obtenidos *in vivo* mediante el análisis de LCRs de animales sometidos a isquemia cerebral muestran la inducción tras el daño cerebral de fragmentos que podrían corresponder a f74 y, también, a un segundo fragmento de menor tamaño. Será interesante establecer qué metaloproteinasas son responsables del procesamiento de TrkB en isquemia cerebral.

Al tener regiones extracelulares idénticas, el ectodominio de TrkB podría corresponder tanto a TrkB-FL como a TrkB-T1. Con la ayuda de vectores lentivirales que expresan cada isoforma de manera neuroespecífica, establecimos que ambas son capaces de sufrir procesamiento por metaloproteinasas en el modelo celular de excitotoxicidad. Además del ectodominio, la actividad de estas proteasas origina fragmentos C-terminales (CTF) anclados en la membrana para ambas isoformas, con movilidades relativas de unos 42 kDa (f42) en el caso de TrkB-FL y unos 6 kDa en el de TrkB-T1 (**Fig. D1**). Utilizando el tamaño de estos fragmentos, calculamos que el punto de ruptura por las metaloproteinasas debería localizarse en regiones extracelulares muy próximas al dominio transmembrana. Este resultado está de acuerdo con lo descrito anteriormente para estas enzimas que suelen procesar regiones pedunculares en sus sustratos situadas entre la membrana plasmática y el primer dominio globular de la proteína (Caescu et al., 2009, Gooz, 2010). Sin embargo, el ectodominio de TrkB desprendido en los modelos celulares de excitotoxicidad es más pequeño de lo esperado teniendo en cuenta que el tamaño total del receptor es 145 kDa y los fragmentos producidos como consecuencia de este procesamiento tienen 74 (ectodominio) y 42 kDa (CTF). Esto podría explicarse por la acción de las metaloproteinasas en múltiples sitios ad-

yacentes del receptor, quedando descartado el procesamiento N-terminal por el mantenimiento del epítipo HA en el ectodominio de las proteínas TrkB recombinantes tal como se mencionó.

La práctica ausencia de f74 y CTFs en las condiciones basales nos indica que el procesamiento de TrkB por metaloproteinasas no se produce de manera constitutiva sino en respuesta a un estímulo excitotóxico. Una vez inducido este proceso, la estabilidad relativa de los fragmentos obtenidos difiere para cada caso. Así, el fragmento extracelular soluble persiste y se acumula en el medio de cultivo durante varias horas mientras que los CTFs de ambas isoformas son degradados adicionalmente por otros sistemas proteolíticos (**Fig. D1**). El fragmento C-terminal de TrkB-FL es susceptible de ser procesado ulteriormente por calpaína y desprender la región citosólica con el dominio tirosina quinasa, el denominado f32. Ambos mecanismos operan de manera completamente independiente y no existe una dependencia funcional entre el procesamiento regulado por metaloproteinasas o calpaína. A diferencia de TrkB-FL, en neuronas sometidas a estímulos excitotóxicos el CTF de TrkB-T1 sufre un procesamiento secuencial mediado por γ -secretasas dando lugar a la liberación de su dominio intracelular (ICD), de tan sólo 2 kDa. Las γ -secretasas son proteínas integrales de membrana constituidas por múltiples subunidades que escinden a sus sustratos dentro del dominio transmembrana. La acción de esta proteasa sobre TrkB-T1 requiere su procesamiento previo por metaloproteinasas, respondiendo a un mecanismo general en dos fases conocido como RIP (Lichtenthaler et al., 2011). Una característica común de los ICDs generados por este tipo de procesamiento es la de su baja estabilidad, por lo que se ha llegado a denominar a las γ -secretasas como el proteasoma de la membrana (Kopan and Ilagan, 2004). Por el contrario, algunos ICDs son fragmentos activos y muestran funciones fisiológicas importantes en la célula, como en el caso de Notch (Bray, 2006). Este receptor y su ligando Delta 1 son necesarios en diversos procesos durante el desarrollo embrionario, y la pérdida de su función está implicada en muchos mecanismos tumorales. El ICD derivado de Notch por procesamiento secuencial, mediado mayoritariamente por ADAM10 y γ -secretasas, puede traslocarse al núcleo y funcionar como un factor de transcripción (De Strooper et al., 1999). En el caso de TrkB-T1, el ICD endógeno producido en excitotoxicidad es demasiado pequeño para ser visualizado directamente con las aproximaciones utilizadas, aunque sí ha podido hacerse de manera indirecta utilizando un receptor recombinante fusionado con la proteína GFP. Estos resultados sugieren que el ICD de TrkB-T1 es estable en neuronas por un tiempo relativamente prolongado, aunque no podemos descartar que la propia fusión esté alterando su estabilidad. Por otra parte, no hemos podido observar el fragmento CTF de TrkB-T1 en los cultivos primarios de corteza cerebral tratados con NMDA pero sí en los incubados con el activador de metaloproteinasas APMA. Ello es probablemente debido a que en este segundo caso se activan metaloproteinasas de neuronas y astrocitos que procesarían la isoforma TrkB-T1 de ambas subpoblaciones, mientras que los agonistas del NMDAR posiblemente sólo activan estas

proteasas en neuronas. En el futuro trataremos de evaluar la estabilidad de los fragmentos de TrkB-T1 producidos por RIP y, en su caso, analizaremos su posible función en excitotoxicidad.

Una conclusión muy interesante de estos resultados es la especificidad diferencial de las γ -secretasas por la isoforma TrkB-T1. Estas proteasas tienen como sustratos proteínas de membrana a las que procesan en el interior de la membrana plasmática, aunque no están bien establecidos los que factores regulan el reconocimiento de sus sustratos (Beel and Sanders, 2008). Su acción es automática tras la proteólisis previa de metaloproteinasas, y el reconocimiento de sus sustratos parece depender únicamente de la longitud de pequeña región extracelular restante en el CTF (Funamoto et al., 2013). Estas secuencias extracelulares, así como la región intramembrana donde tiene lugar el procesamiento son idénticas en TrkB-FL y TrkB-T1. Sin embargo, TrkB-FL no es sustrato de las γ -secretasas, como lo demuestra el uso de un inhibidor específico que no impide la aparición de sus fragmentos ni aumenta los niveles de su CTF, f42. Además, el tratamiento con el activador de las metaloproteinasas APMA no es suficiente para inducir el procesamiento secuencial de TrkB-FL por γ -secretasas, como ocurriría en el caso que se tratase de un sustrato. Estos datos sugieren, por tanto, que secuencias dentro de la región intracelular específica de TrkB-FL interfieren de algún modo la acción de las γ -secretasas, aunque será necesario un análisis en mayor profundidad para probar esta hipótesis.

Una cuestión importante es establecer cuál es la contribución relativa de los diferentes mecanismos de regulación del receptor TrkB inducidos por la sobreactivación de los NMDARs a la muerte neuronal asociada a procesos de excitotoxicidad e isquemia cerebral. En el modelo celular de excitotoxicidad, diversas evidencias señalan al procesamiento de TrkB por metaloproteinasas como un mecanismo cuantitativamente minoritario. En primer lugar, en condiciones de excitotoxicidad, la recuperación en los niveles del receptor completo TrkB-FL es mayor en presencia de inhibidores de calpaína que de metaloproteinasas y, aunque el tratamiento combinado con ambos mejora los resultados, tampoco es posible recuperar completamente la proteína TrkB-FL. Estos resultados apoyan una importancia relativa de los mecanismos transcripcionales que inhiben la acumulación del ARNm de TrkB-FL y potencian la del de TrkB-T1, ambos codificados por el gen *Ntrk2* (Vidaurre et al., 2012). En el caso de la isoforma TrkB-T1, la sobreactivación de los NMDARs en los cultivos primarios induce un aumento neto de esta isoforma lo que indica que el mecanismo transcripcional prevalece sobre la acción enzimática de metaloproteinasas y γ -secretasas. No obstante, la actividad de las metaloproteinasas sobre TrkB parece ejercer un papel mucho más importante en los modelos animales de isquemia cerebral. A este respecto, en ensayos de WB se produce una disminución en la señal de TrkB-T1 en la región del infarto, tanto en modelos de isquemia cerebral inducida en ratones por fototrombosis (este trabajo) o en ratas por oclusión de la ACM (Gomes et al., 2012). Contraponiéndose a estos resultados, el análisis por inmunohistoquímica evidencia un aumento de los niveles de esta isoforma en las neuronas de la zona de lesión respecto una zona contralateral equiparable, tanto en el modelo de isquemia cerebral permanente utilizado en esta tesis como en un modelo de rata

por oclusión de la ACM (Vidaurre et al., 2012). Esta aparente contradicción podría tener su explicación en la presencia de TrkB-T1 en células gliales (Ohira et al., 2005b), que también podría sufrir RIP como las neuronas. De esta manera, el incremento de la señal en inmunohistoquímica correspondería con el aumento de expresión de este receptor en neuronas y, además, con los productos de procesamiento CTF e ICD capaces de ser reconocidos por el anticuerpo específico para TrkB-T1. Por el contrario, el análisis de los extractos celulares mediante WB evidenciaría la disminución sufrida en astrocitos por estos sistemas proteolíticos, puesto que la abundancia de las células gliales en corteza cerebral es mayor que la de neuronas (Nedergaard et al., 2003).

Por último, independientemente de su peso específico, creemos que este mecanismo de procesamiento de TrkB podría contribuir muy activamente a la muerte neuronal excitotóxica. Por una parte, la proteólisis por metaloproteinasas de TrkB-FL contribuye a la disminución de los niveles de este receptor, truncando vías de señalización dependientes de su función esenciales en la supervivencia neuronal. Por otra parte, aunque el procesamiento de TrkB-T1 podría considerarse *a priori* como beneficioso para la neurona, por reducir los niveles de una isoforma que puede actuar como dominante negativo de la función de TrkB-FL, cabe la posibilidad de que los fragmentos intracelulares resultantes tengan algún papel en la muerte neuronal. Probablemente, la consecuencia más importante del procesamiento de ambas isoformas de TrkB por metaloproteinasas sea la liberación del ectodominio al medio extracelular, que podría unirse a su ligando y reducir su disponibilidad para el receptor anclado en la membrana. De hecho, el dominio extracelular de TrkB fusionado a la cadena pesada de la IgG (quimera TrkB-Fc, Shelton et al., 1995) es utilizado muy frecuentemente para secuestrar BDNF y NT-4 del medio y reducir la señalización neurotrófica. Así, el tratamiento de cultivos de neuronas hipocámpales con este compuesto durante 48 h induce su muerte por procesos de apoptosis (Mariga et al., 2014), lo que resalta la importancia de la privación trófica en la patogénesis de numerosas enfermedades neurodegenerativas (Allen et al., 2013). Como se mencionó anteriormente, el ectodominio de TrkB liberado en el modelo celular de excitotoxicidad contiene sus secuencias N-terminales, al menos hasta el aminoácido 360. Teniendo en cuenta que el motivo IgC2 (aminoácidos 295-365) de TrkB es el responsable de su interacción con BDNF, podemos sugerir que f74 tiene la capacidad de unirse a su ligando y contribuir de este modo a la muerte neuronal. Será muy interesante analizar experimentalmente si esta hipótesis es correcta.

2. Fragmentos intracelulares resultantes del procesamiento de TrkB como posibles biomarcadores en el ictus

La diagnosis rápida e inequívoca del ictus de tipo isquémico es extremadamente importante para el inicio temprano de la terapia trombolítica, efectiva únicamente cuando se administra <4.5 h del inicio de los síntomas. Este tratamiento va a permitir mejorar el pronóstico de estos pacientes y disminuir su grado de discapacidad. Es muy importante poder diferenciar la isquemia

cerebral de otras patologías con síntomas similares (tumores cerebrales, ataques epilépticos, migrañas) o discriminar entre los diferentes tipos de ictus ya que, por ejemplo, la terapia con tPA está completamente contraindicada en el caso del tipo hemorrágico. Por ello, en los últimos años ha adquirido especial importancia el desarrollo de pruebas bioquímicas simples y de bajo coste basadas en marcadores sanguíneos, que tienen como fin acelerar y mejorar las evaluaciones diagnóstica y de pronóstico. Actualmente, el diagnóstico del ictus se basa en el examen clínico del paciente junto con técnicas de imagen cerebral (tomografía axial computerizada y resonancia magnética nuclear)(revisado en Whiteley et al., 2008, Jickling and Sharp, 2011), no siendo estas últimas accesibles de manera inmediata para muchos pacientes de ictus. Entre la amplia variedad de biomarcadores descritos para isquemia cerebral, se incluyen fragmentos derivados de la proteólisis de diversos sustratos por calpaína o caspasas, que son liberados al medio durante la muerte neuronal (Siman et al., 2004). En consecuencia, los fragmentos resultantes del procesamiento de TrkB por diversos sistemas proteolíticos, inducidos específicamente en condiciones de excitotoxicidad, también podrían difundir a la sangre o al LCR y ser detectados en individuos que han sufrido un infarto cerebral. Entre ellos, el ectodominio de TrkB liberado por la acción de metaloproteinasas es un claro candidato, por su relativa estabilidad y porque no requiere la completa degeneración neuronal para propagarse por el medio extracelular. Sin embargo, será necesario corroborar previamente la activación de este proceso en la isquemia cerebral de humanos. Los resultados preliminares, obtenidos mediante el análisis del LCR de ratas sometidas a isquemia cerebral por oclusión distal de la ACM, muestran la inducción específica tras el daño cerebral de fragmentos correspondientes al ectodominio de TrkB. No obstante, el fragmento identificado en el LCR posee un tamaño de 66 kDa, menor que el detectado previamente en el modelo celular de excitotoxicidad (f74). Estos datos nos indican que el ectodominio de TrkB podría sufrir procesamiento posterior una vez liberado al medio extracelular, posiblemente en su región N-terminal puesto que al ser reconocido por el anticuerpo panTrkB debe contener la secuencia 160-340. Como se ha indicado anteriormente, una candidata responsable de esta proólisis ulterior podría ser MMP-9, ya que se ha demostrado que procesa a TrkB en su extremo N-terminal en un modelo animal de diabetes (Navaratna et al., 2013). Esta es una enzima que juega un papel esencial en la isquemia cerebral, fundamentalmente en inflamación, proceso que induce su expresión y liberación al medio extracelular donde puede ser activada por radicales libres, tPA y otras moléculas producidas tras el daño isquémico (revisado en Morancho et al., 2010, Chaturvedi and Kaczmarek, 2014). Es interesante comprobar que el fragmento del dominio extracelular de TrkB puede difundir al LCR tempranamente tras la oclusión de la ACM, puesto que podría utilizarse como marcador de los primeros estadios del ictus isquémico. Una vez establecida su presencia en el LCR, será interesante investigar su posible aparición en el suero de estos mismos animales. Sin embargo, este tipo de determinación presenta dificultades adicionales.

les derivadas de la presencia de proteínas mayoritarias en el suero (BSA, cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas) de tamaños moleculares similares al de los fragmentos investigados.

Otro posible biomarcador es el fragmento C-terminal de TrkB-FL generado por calpaína, que se acumula abundantemente y persiste en la región del infarto después de inducir la lesión en ratones mediante isquemia cerebral permanente. Los datos preliminares presentados en esta tesis indican que f32 puede ser detectado de manera basal en el suero de ratón, rata y humano. Sin embargo, los niveles de este fragmento aumentan en el suero de ratones y ratas que han sufrido isquemia cerebral, obtenido 24 h tras el inicio de la lesión. En el caso del paciente humano analizado, f32 se acumula a lo largo del tiempo al comparar el suero recogido en el momento del ingreso hospitalario, antes del inicio del tratamiento con tPA, respecto al extraído 24 h después. Por otro lado, este fragmento no ha podido ser detectado en los LCRs analizados, posiblemente porque fueron obtenidos tan sólo 2 h tras la lesión isquémica y f32 podría requerir tiempos más prolongados para su difusión a los líquidos corporales. Estos resultados sugieren que f32 también tiene potencial como biomarcador de la isquemia cerebral, aunque en este caso proporcionaría información de estadíos más tardíos del ictus isquémico.

Antes de iniciar un estudio a mayor escala sobre el uso de los fragmentos de TrkB como biomarcadores en el ictus conviene tener en cuenta una serie de consideraciones. En primer lugar, TrkB-FL se expresa en células no neuronales como los linfocitos B y T (Schuhmann et al., 2005, De Santi et al., 2009), aunque en pequeñas cantidades, por lo que en principio sería posible hallar el receptor completo en sangre en condiciones basales (Zhou et al., 2013). Generalmente, las pruebas bioquímicas para la detección de marcadores sanguíneos utilizadas en un ambiente hospitalario se basan en ensayos de tipo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) que no son capaces *a priori* de discriminar entre las proteínas completas y sus fragmentos. Una posible solución a este problema potencial sería desarrollar anticuerpos específicos para los nuevos epítomos que son generados tras el procesamiento de TrkB, aprovechando que los extremos N- y C-terminales producidos tienen propiedades antigénicas diferentes que esa misma secuencia dentro de la proteína intacta (Mort and Buttle, 1999). Este tipo de anticuerpos, que no reconocen la proteína completa pero si un determinado fragmento, han sido desarrollados con éxito para muchas proteínas como, por ejemplo, espectrina (dirigidos a sus fragmentos de 150 y 145 kDa producto de calpaína; Bahr et al., 1995), caspasa-3 (específicos para la forma activa de la proteína p17; Kourou et al., 1998) o APP (múltiples anticuerpos comerciales con especificidad para los diferentes péptidos generados). Otro aspecto importante es que, dado que el proceso de excitotoxicidad es común a muchas enfermedades neurodegenerativas, será necesario analizar muestras de diversas patologías neurológicas para establecer si el posible biomarcador investigado es específico de la isquemia cerebral o esta asociado de una forma más general con el daño cerebral. Este podría ser el caso de f32, producto de la acción de calpaína en isquemia cerebral, que también se detecta en tejido postmortem de pacientes de la enfermedad de Alzheimer (Jeronimo-Santos et al., 2014). La activación de la calpaína, inducida en este caso por el péptido A β , sería también responsable

en esta patología del procesamiento de TrkB y del bloqueo de las acciones neuromoduladoras de BDNF. En cualquier caso, este fragmento podría ser también de utilidad como biomarcador en la prognosis del ictus isquémico, ayudando a la toma de decisiones durante su fase aguda y al diseño de estrategias a más largo plazo para tratar de prevenir su recurrencia. Ésta ya es una práctica común en el diagnóstico y pronóstico de otras patologías como, por ejemplo, el infarto de miocardio agudo (determinación de troponina) o en el inicio de las terapias para reducción lipídica (LDL). Para ello, será necesario estudiar en un futuro la evolución de los niveles de f32 presente en la sangre de los pacientes de ictus, estableciendo una correlación con sus datos clínicos y así determinar el poder predictivo de este potencial biomarcador de isquemia cerebral.

3. Exploración de estrategias de neuroprotección basadas en la interferencia del procesamiento por calpaína de TrkB-FL en excitotoxicidad

La excitotoxicidad desencadena una serie de mecanismos responsables de reducir la señalización neurotrófica mediada por el receptor TrkB lo que contribuye al desarrollo de la muerte neuronal. Entre dichos mecanismos se incluyen la disminución en la expresión de TrkB-FL y un aumento en la forma truncada TrkB-T1, el procesamiento de la isoforma completa por la acción enzimática de calpaína, y la liberación mediada por metaloproteinasas del ectodominio de TrkB con capacidad para secuestrar la neurotrofina BDNF del medio extracelular. Previamente nuestro grupo demostró que el restablecimiento del balance en los niveles de estos receptores de neurotrofinas tenía carácter neuroprotector frente a la sobreactivación de los NMDARs (Vidaurre et al., 2012). Por consiguiente, en este trabajo decidimos desarrollar estrategias destinadas a la interferencia de algunos de los mecanismos responsables de estas alteraciones con el fin de evaluar su potencial terapéutico.

3.1 Sustitución de la secuencia en torno al aminoácido 649 en TrkB-FL

En un trabajo previo del laboratorio secuenciamos el extremo N-terminal del fragmento intracelular de TrkB-FL derivado de su procesamiento por calpaína utilizando el método de Edman (Vidaurre, 2011). El resultado obtenido fue la secuencia Q-S-Q-X-R-S, donde X podía ser cualquier aminoácido, encontrándose el mayor grado de coincidencia a partir de la posición 649 de TrkB-FL (Q-S-Q-M-L-H). En base a estos resultados, generamos un mutante de TrkB-FL (HA-TrkB-FL-Mt) en el que sustituimos los aminoácidos 646-651 por otros que según la base de datos CaMPDB aparecen con muy baja frecuencia en las secuencias que se ha demostrado son procesadas por calpaína (CaMPDB; duVerle et al., 2010). Seguidamente, con la ayuda de vectores lentivirales, evaluamos la estabilidad del receptor mutante en neuronas sometidas

a condiciones excitotóxicas. De acuerdo a la hipótesis de partida, en los cultivos que expresan la forma mutante de TrkB-FL fusionada con GFP (HA-TrkB-FL-Mt-GFP) no se produce el fragmento C-terminal, que sí es originado en las células que expresan la proteína recombinante salvaje (HA-TrkB-FL-GFP), tras la sobreactivación de los NMDARs. Decidimos entonces analizar el efecto de esta mutación sobre la viabilidad neuronal en condiciones de excitotoxicidad, utilizando un lentivirus dual que sobreexpresa la isoforma TrkB-FL al tiempo que disminuye los niveles de TrkB-T1, y que previamente había demostrado capacidad neuroprotectora (Vidaurre et al., 2012). Sorprendentemente, la supervivencia neuronal no mejora en la células en las que se interfiere la expresión de TrkB-T1 y se expresa la forma mutante HA-TrkB-FL-Mt, ni siquiera de una forma equiparable a la que proporciona el lentivirus homólogo que expresa el receptor salvaje. Este resultado es probablemente debido a la incapacidad de HA-TrkB-FL-Mt-GFP o HA-TrkB-FL-Mt para activarse en respuesta a BDNF, por lo que la expresión de este mutante podría tener un efecto deletéreo en la neurona al formar homodímeros o heterodímeros afuncionales que no pueden desencadenar las vías de señalización prosupervivencia.

Posteriormente a la obtención de estos resultados, un estudio similar estableció que la secuencia del fragmento C-terminal de TrkB-FL producido por calpaína es S-Q-L-K-D (Jeronimo-Santos et al., 2014), que presenta una pequeña similitud con la descrita anteriormente por nuestro grupo (Q-S-Q-M-L-H). De acuerdo a estos resultados, el sitio de procesamiento por esta proteasa no se encuentra localizado entre las posiciones 648 y 649 de TrkB-FL, sino entre los aminoácidos 519 y 520. No obstante, a pesar del error, los resultados proporcionados por el mutante HA-TrkB-FL-Mt sugieren conclusiones interesantes. Por una parte, la pérdida de la función del receptor TrkB-FL mutante parece afectar a su proteólisis por calpaína. Anteriormente se ha demostrado que la actividad de esta proteasa está frecuentemente regulada por el estado de fosforilación de sus sustratos. En algunos casos, la fosforilación en determinados residuos previene su procesamiento por calpaína, como por ejemplo en la espectrina (Nicolas et al., 2002, Nedrelow et al., 2003), GSK3 β (Ma et al., 2012) o Kidins220 (Lopez-Menendez et al., 2013). Sin embargo, otras veces, la fosforilación del sustrato es un factor inductor de su procesamiento por calpaína, como por ejemplo en el caso de las subunidades GluR1 de los receptores AMPA (Yuen et al., 2007) o la proteína KAP (*Kidney androgen-regulated protein*) (Tornavaca et al., 2011). En el caso de TrkB-FL, una posibilidad es que, dada la proximidad del sitio de procesamiento y la Y515, el estado de fosforilación de este residuo module positivamente de alguna manera el reconocimiento por la calpaína, aunque tampoco podemos descartar un papel del estado de fosforilación de la Y816. Por contraste, la pérdida de la fosforilación en estas tirosinas en el mutante de TrkB-FL, como consecuencia de la mutación en la secuencia ⁶⁴⁶ELTQSQ⁶⁵¹, impediría la acción de esta proteasa sobre su sustrato. Un aspecto muy interesante es comprender cómo una mutación realizada en la secuencia 646-651 de TrkB-FL, que no afecta a aminoácidos clave en la unión de ATP o la reacción de autofosforilación, sea capaz de alterar la fosforilación de los residuos Y515 y Y816 y la activación de TrkB. Los aminoácidos sustituidos en el mutante están localizados en el límite de una secuencia conocida como el dominio KID (*kinase insert domain*, residuos 631-647).

Esta región es una de las menos conservadas dentro del dominio tirosina quinasa de TrkA, TrkB y TrkC, por lo que se ha propuesto como diana para el desarrollo de inhibidores específicos de estos receptores (Bertrand et al., 2012). Este dominio no sólo aparece en las proteínas Trk sino que también está presente en una gran parte de la superfamilia de los RTKs, donde puede participar en la regulación de su actividad a través de su fosforilación en residuos de tirosina, serina o treonina, dentro de KID o en sus inmediaciones. Además, una fosforilación anómala de KID en estos aminoácidos está asociada con ciertas patologías (revisado en Locascio and Donoghue, 2013). En el KID de TrkB, los únicos residuos fosforilables son las treoninas 645, dentro del propio dominio, o 648, adyacente a él, que es sustituida por un residuo de isoleucina en la proteína TrkB-FL mutante. Por tanto, una posibilidad es que la pérdida de la fosforilación en el residuo T648 tenga un efecto inhibitorio sobre la activación del receptor. Mediante la generación y análisis de mutantes puntuales de TrkB-FL será posible abordar si la hipótesis anterior es correcta. En conclusión, los resultados mostrados en este trabajo indican que un receptor TrkB-FL no fosforilable es más resistente frente al procesamiento por calpaína que la forma salvaje, lo que sugiere que la acción de esta proteasa es susceptible al estado de fosforilación de este sustrato, y apuntan al KID de este receptor como un elemento importante en la regulación de su función.

3.2 Péptidos dirigidos a la interferencia del procesamiento de TrkB-FL por calpaína

En los últimos años, una de las estrategias que ha demostrado resultados más prometedoras para el tratamiento de la excitotoxicidad y la isquemia cerebral ha sido el uso de pequeños péptidos derivados de la proteína transactivadora Tat del VIH. Estos péptidos generalmente van dirigidos a bloquear interacciones proteicas o reacciones de procesamiento que puedan ser nocivas en isquemia o en aquellas otras patologías asociadas al proceso de excitotoxicidad (revisado en Lai et al., 2014). Por ello, contienen dominios de interacción proteica o secuencias de procesamiento junto con el dominio de transducción de la proteína Tat, que confiere al péptido resultante sus propiedades de permeabilidad, permitiéndole atravesar las membranas celulares y la BHE. Como se mencionó, la entrada de estos péptidos en la célula por endocitosis está favorecida en condiciones de excitotoxicidad (Vaslin et al., 2011), lo que convierte a los CPPs en una herramienta especialmente atractiva para el desarrollo de compuestos terapéuticos en enfermedades con un componente excitotóxico, como son muchas situaciones de daño cerebral agudo y diversas enfermedades neurodegenerativas. Particularmente estimulantes han sido los resultados obtenidos con el péptido que desacopla el complejo NMDAR-PSD95-NOS en un ensayo clínico de fase 2, donde se ha demostrado que NA-1 es capaz de reducir el número de infartos isquémicos iatrogénicos en pacientes en los que se realiza reparación endovascular de un aneurisma intracraneal (Hill et al., 2012). Tras muchos fracasos anteriores (Ikono-

midou and Turski, 2002), estos resultados prueban que es posible conseguir neuroprotección en humanos frente al ictus utilizando estrategias dirigidas contra la señalización excitotóxica.

Dado el papel central de la vía BDNF/TrkB en la supervivencia neuronal, decidimos generar péptidos Tat con secuencias de TrkB-FL (TFL) con los que tratar de prevenir el procesamiento de este receptor inducido por calpaína en condiciones de excitotoxicidad. Por su mayor probabilidad para contener el sitio de corte por esta enzima, diseñamos los péptidos TFL₄₅₇ (457-471), TFL₄₈₂ (482-495), TFL₅₁₈ (518-532), TFL₅₄₁ (541-555) y TFL₆₃₉ (639-652). Elegimos como control de estos experimentos un péptido que posee los aminoácidos 408-421 del factor de transcripción c-Myc (TMyC), utilizado previamente en otros trabajos (Tashev et al., 2009, Chiodi et al., 2014). Corroboramos su inocuidad para las neuronas corticales y su capacidad para penetrar al interior celular mediante ensayos de viabilidad y técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal. A continuación, evaluamos el efecto de los diferentes péptidos en excitotoxicidad y comprobamos que solamente TFL₄₅₇ era capaz de prevenir el procesamiento de TrkB-FL, resultado que se correlacionaba con su capacidad para proteger frente a la muerte neuronal. No obstante, una caracterización más detallada del mecanismo neuroprotector de TFL₄₅₇ muestra que la secuencia que contiene se encuentra relativamente alejada del sitio de ruptura de calpaína en TrkB-FL demostrado recientemente (Jeronimo-Santos et al., 2014) y, adicionalmente, su acción no sólo interfiere la actividad de esta proteasa sino también, y con mayor eficacia, su proteólisis enzimática por metaloproteinasas. Por tanto, TFL₄₅₇ no parece impedir directamente la unión de calpaína a su sustrato, sino que su mecanismo protector es posiblemente ejercido de manera más indirecta y afecta simultáneamente a secuencias extra e intracelulares próximas a su región transmembrana. Los posibles mecanismos de acción de este péptido neuroprotector serán discutidos en mayor detalle en el siguiente epígrafe.

La falta de eficacia del resto de péptidos Tat ensayados para interferir la acción enzimática de calpaína sobre TrkB-FL resulta especialmente notable en el caso de TFL₅₁₈ puesto que, tal como se estableció (Jeronimo-Santos et al., 2014), contiene la secuencia identificada de procesamiento. Anteriormente, estrategias similares han demostrado ser efectivas para otros sustratos de calpaína como TRPC6 (Du et al., 2010), el receptor de glutamato mGluR1 (Xu et al., 2007) y CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2, Yin et al., 2013). Este contraste podría deberse a la necesidad de una secuencia más amplia que la utilizada en los péptidos TFL para ser reconocida por calpaína como sustrato. De hecho, los resultados previos sugerían una participación de la fosforilación en la Y515 de TrkB-FL para la acción de calpaína, residuo muy próximo a la posición 520 donde se produce la ruptura. Un claro ejemplo de la importancia del entorno aminoacídico para un anclaje correcto es el de la proteína FRS2, que se une a la Y515 de TrkB-FL (Kao et al., 2001). Esta proteína es capaz de interactuar con péptidos de TrkB-FL correspondientes a esta región, presentando mayor afinidad a medida que las secuencias peptídicas tienen mayor longitud (Zeng et al., 2014). Será interesante explorar esta hipótesis e intentar optimizar el reconocimiento por calpaína mediante el diseño de nue-

vos péptidos TFL. No obstante, un péptido más largo presentaría algunos problemas por su menor permeabilidad celular y porque la incorporación de un residuo tirosina tan importante para la función de TrkB-FL podría interferir las vías de señalización de ERK/MAPK y PI3K.

4. Péptidos con capacidad neuroprotectora en excitotoxicidad

4.1 Péptido TFL₄₅₇: interferencia del procesamiento de TrkB-FL por calpaína y metaloproteinasas

El péptido TFL₄₅₇ reduce el procesamiento de TrkB-FL en el modelo celular de excitotoxicidad, lo que se asocia con una mejora en la supervivencia neuronal tanto en condiciones de daño crónico como cuando el péptido se administra posteriormente a un daño agudo. La acción neuroprotectora de TFL₄₅₇ es más potente que la proporcionada por los inhibidores de calpaína y requiere la activación de la vía PLC γ , a diferencia de las rutas de ERK/MAPK y PI3K que no participan en este efecto. Esta discrepancia está directamente asociada con el estado de fosforilación de la Y515 y la Y816 de TrkB-FL: el menor procesamiento de este receptor por acción del péptido TFL₄₅₇ se acompaña del mantenimiento en la fosforilación de la Y816, encargada del reclutamiento y activación de PLC γ (Obermeier et al 1993). Por el contrario, la Y515, responsable de iniciar las vías ERK/MAPK y PI3K (Reichardt, 2006), ve disminuida su fosforilación en excitotoxicidad independientemente de la presencia del péptido y la estabilización del receptor. Probablemente, esto sea debido a otros mecanismos que operan sobre este residuo en excitotoxicidad, como la activación de la fosfatasa Shp-2 (Rusanescu et al., 2005). El péptido TFL₄₅₇ también mejora la estabilidad de otras proteínas relacionadas con la supervivencia neuronal como la subunidad GluN2A de los NMDARs, cuyos niveles también se ven reducidos como consecuencia de la acción de calpaína en excitotoxicidad e isquemia cerebral (Gascon et al., 2008). Además, la presencia de este péptido atenúa significativamente el silenciamiento que experimenta el factor de transcripción prosupervivencia CREB como consecuencia del incremento en los niveles intracelulares de Ca²⁺ (Hardingham and Bading, 2002). Esta protección de la actividad de CREB podría ser mediada por CaMKII o CaMKIV (Deisseroth et al., 1996), ambas proteínas efectoras tanto de la vía de PLC γ de TrkB (Minichiello et al., 2002) como de los NMDARs (Bading et al., 1993). Algunos de los genes regulados por CREB mejor caracterizados son BDNF (Tao et al., 1998) y el propio receptor TrkB (Deogracias et al., 2004), por lo que la acción de TFL₄₅₇ potenciaría la producción de esta neurotrofina y su receptor que, a su vez, retroalimentarían toda la vía y serían responsables de la neuroprotección a largo plazo. Hay que resaltar que el péptido TFL₄₅₇ no altera la acumulación de TrkB-T1 inducida en excitotoxicidad ni el procesamiento de otros sustratos de calpaína, como la espectrina. Por

tanto sugerimos que las acciones neuroprotectoras de TFL₄₅₇ son específicas y, al confluir sobre vías de supervivencia diferentes, interrelacionadas a su vez entre sí, resultan altamente eficaces.

El péptido TFL₄₅₇ tiene un efecto similar al observado para los fármacos antidepresivos. Estas drogas activan TrkB-FL de manera indirecta e independiente de BDNF (Rantamaki et al., 2011), aumentando la señalización mediada por PLC γ , aunque sin ejercer ningún efecto sobre la fosforilación de la Y515 y sus rutas asociadas (Yagasaki et al., 2006, Rantamaki et al., 2007). Además, su activación de la PLC γ induce la fosforilación de CREB (Rantamaki et al., 2007), que es necesaria para el efecto antidepresivo a largo plazo (revisado en Nestler et al., 2002). De hecho, la restauración por los fármacos antidepresivos de la señalización BDNF/TrkB es uno de los pilares principales de la hipótesis neurotrófica de la depresión, que incluso propone un carácter antidepresivo a cualquier molécula capaz de restablecer estas vías (Nestler et al., 2002). Por tanto, podemos sugerir que el péptido TFL₄₅₇, que no potencia la vía BDNF/TrkB en condiciones basales sino solamente en estados patológicos, podría tener un efecto antidepresivo además de neuroprotector. Esto sería especialmente interesante ya que una de las complicaciones secundarias más importante de la isquemia cerebral es la depresión post-ictus (Dafer et al., 2008, Gaete and Bogousslavsky, 2008). Esta condición dificulta la rehabilitación y recuperación de los pacientes desde un punto de vista funcional y cognitiva, y aumenta la mortalidad.

Teniendo en cuenta las importantes consecuencias que TFL₄₅₇ tiene en la supervivencia y señalización celulares, sería interesante conocer el mecanismo preciso por el que este péptido ejerce su acción. La secuencia de TrkB-FL contenida en TFL₄₅₇ corresponde a su región yuxtamembrana citoplásmica proximal, y sus 9 primeros aminoácidos son comunes para las otras isoformas del receptor. Ésta es una secuencia muy conservada en distintas especies y, dentro de ella, los aminoácidos KFG (460-463) están presentes en todos los receptores Trk, por lo parece tener una importante función biológica. En general, las regiones yuxtamembrana de los receptores transmembrana son críticas para la señalización celular y están frecuentemente enriquecidas en dominios proteicos no estructurados conteniendo cortos motivos proteicos conservados, propuestos como determinantes clave de las interacciones proteicas establecidas por el receptor (Stavropoulos et al., 2012). En TrkA, utilizando células PC12, estos tres aminoácidos se han definido como punto adicional a los sitios de autofosforilación para la activación de FRS2 y la neuritogénesis promovida por el NGF (Peng et al., 1995). Sin embargo, la fosforilación en TrkA de la Y490 (equivalente a la Y515 de TrkB) es predominante e incluso imprescindible para la unión de esta molécula adaptadora con el receptor (Meakin et al., 1999), e incluso el papel de KFG en esta interacción se ha puesto en duda para otras líneas celulares (Eggert et al., 2000). Recientemente, se ha comprobado que la delección de la secuencia KFG en (Hollis et al., 2009) TrkA produce un aumento en sus niveles y actividad, mejorando su señalización en presencia de NGF. El control inhibitorio de esta secuencia de TrkA requiere la mono-ubiquitinación de su residuo K490 (Kiris et al., 2014), que podría ser un mecanismo responsable de su internalización y tasa de recambio en modo similar a lo descrito en general para los RTKs (Haglund et al., 2003).

La mono-ubiquitinación es un proceso complejo que depende de varias enzimas E3 ligasa que, concretamente, en el caso de TrkB podrían ser c-Cbl (Pandya et al., 2014), TRAF6 (Jadhav et al., 2011) o SOCS2 (Uren et al., 2014), siendo esta última la candidata más probable por unirse a una zona muy próxima a la secuencia KFG. Otra proteína interaccionante con la región yuxtamembrana de TrkB-FL, aunque en esta ocasión con una región mucho más amplia (453-536) no presente en TrkB-T1, es Hrs, proteína encargada del reciclaje del receptor endocitado (Huang et al., 2009). En consecuencia, como se resume en la **Fig. D2**, el conjunto de las evidencias anteriores

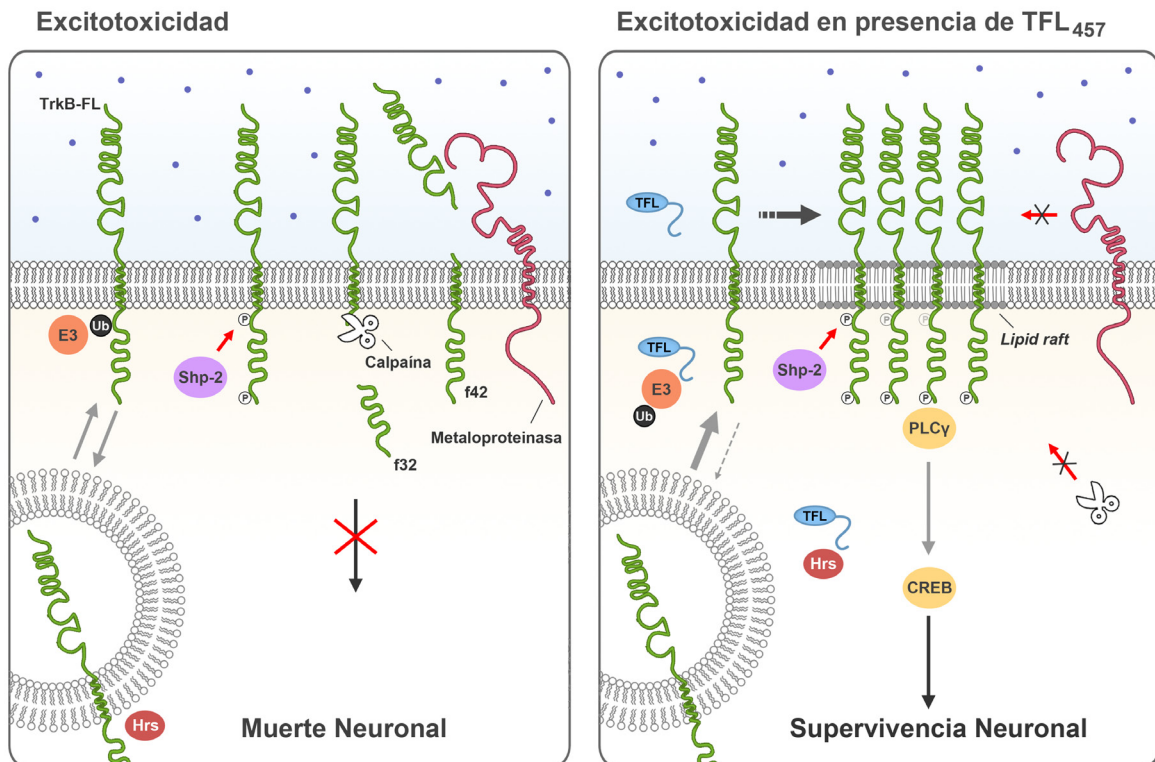


Figura D2. Modelo de la acción de TFL₄₅₇ en excitotoxicidad. La presencia del péptido TFL₄₅₇ mejora la supervivencia de las neuronas en condiciones excitotóxicas mediante el mantenimiento de los niveles de TrkB-FL y otras proteínas relacionadas como CREB, a través de la interferencia de la acción proteolítica de calpaína y metaloproteinasas sobre el receptor. La vía de señalización de PLCγ es la principal responsable de este efecto neuroprotector, probablemente porque las rutas de MAPK/ERK y Akt son silenciadas debido a mecanismos adicionales que operan sobre TrkB-FL en excitotoxicidad, como la desfosforilación de la Y515 por Shp-2. Un posible modo de acción de TFL₄₅₇ sería favorecer el traslado de TrkB-FL hacia compartimentos donde el receptor sea más resistente a los diversos sistemas proteolíticos como, por ejemplo, los lipid rafts. El bloqueo de la monoubiquitinación de la K460 contenida en TFL₄₅₇ también podría ayudar a mantener al receptor en la membrana plasmática y potenciaría sus vías de señalización. Por otra parte, la proteína Hrs reguladora del reciclaje y degradación de los endosomas que contienen TrkB-FL, también podría ser desplazada por TFL₄₅₇ de la región yuxtamembrana con la que interacciona, potenciando el reciclaje de estos endosomas hacia la membrana plasmática a través de la ruta por defecto, como ocurre en el caso de TrkB-T1.

permite sugerir que TFL₄₅₇ podría modificar la localización subcelular del receptor, situándolo en compartimentos donde la acción enzimática de calpaína y metaloproteinasas sea más restringida, como el endosoma señalizador o los *lipid rafts*. En estos últimos, las proteínas ADAMs parecen quedar excluidas (Kojro et al., 2001, Harris et al., 2009), probablemente por la presencia de caveolina (Takaguri et al., 2011), lo que podría evitar el procesamiento de TrkB-FL y potenciar sus vías de señalización (Zonta and Minichiello, 2013), manteniendo la viabilidad neuronal.

El desarrollo de péptidos bioactivos específicos para una diana determinada que resulta alterada como consecuencia de una patología tiene gran interés dentro del campo de la neurofarmacología clínica. En esa línea, hemos realizado experimentos preliminares para estudiar la acción del péptido TFL₄₅₇ en un modelo animal de isquemia cerebral, donde el proceso de excitotoxicidad tiene lugar *in vivo*. Hemos seleccionado un modelo murino de isquemia cerebral permanente inducida por fototrombosis (Schroeter et al., 2002) por tratarse de un modelo reproducible, relativamente sencillo y relevante para el estudio de la isquemia humana, que da lugar a patrones histológicos similares a los encontrados en infartos humanos (Pevsner et al 2001). Sin embargo, la administración de este péptido 30 minutos antes del inicio de la lesión no es capaz de reducir el volumen del infarto en estos animales, a pesar de los prometedores resultados obtenidos con el modelo celular. No obstante, tampoco hemos podido observar ningún efecto para el péptido NA-1, que anteriormente ha demostrado eficacia neuroprotectora en otros modelos de isquemia cerebral utilizando dosis equiparables a las empleadas en nuestros experimentos (Aarts et al., 2002, Soriano et al., 2008, Sun et al., 2008, Bell et al., 2013). La falta de efecto neuroprotector del péptido NA-1 también en el modelo de excitotoxicidad *in vitro*, a no ser que se utilicen concentraciones al menos 100 veces superiores a las descritas (Aarts et al., 2002) (datos no mostrados), nos lleva a cuestionar temas relacionados con la accesibilidad y estabilidad de los péptidos utilizados, factores que podrían ser críticos en los experimentos *in vivo*. De hecho, algunos de los retos más importantes para la terapia peptídica son los relacionadas con las vías de administración, la optimización de su permeabilidad a través de la membrana plasmática y la BHE, y la biodisponibilidad de los péptidos terapéuticos. En los últimos años se ha avanzado mucho en el diseño de los CPPs (Dietz and Bahr, 2004, Lai et al., 2014) así como en el desarrollo de vías alternativas de administración como las nasales o bucales (Lochhead and Thorne, 2012, Rhim et al., 2013). Sin embargo, es necesario seguir trabajando para mejorar la estabilidad y la biodisponibilidad de estos péptidos, prolongando su vida media en el torrente sanguíneo y mejorando sus propiedades farmacocinéticas. Otra posible explicación a la falta de efecto neuroprotector es que la severidad del modelo limite la acción de los péptidos. La isquemia cerebral por fototrombosis se caracteriza por una rápida progresión del infarto y la ruptura de la integridad endotelial que dan lugar a un edema vasogénico considerable (Carmichael, 2005, Dirnagl, 2010). Esto conlleva una zona relativamente pequeña de penumbra, que es el tejido potencialmente recuperable donde los péptidos podrían ejercer su efecto neuroprotector. En ese caso, sería necesario evaluar la acción de TFL₄₅₇ en otros modelos diferentes de infarto cerebral. Sin embargo, este mismo modelo ha permitido demostrar efectos neuroprotectores para

otros compuestos (Park et al., 2011, Lorrio et al., 2013, Egea et al., 2014). Además, la capacidad para prevenir la progresión del infarto en este modelo depende de la dosis de fármaco utilizada, como se ha comprobado en el caso de la memantina, (Stieg et al., 1999, Lopez-Valdes et al., 2014). Es más, dosis no neuroprotectoras de memantina también proporcionan efectos beneficiosos en la recuperación funcional, que están asociados con un incremento de la vía BDNF/TrkB (Lopez-Valdes et al., 2014). Por tanto, teniendo en cuenta que TrkB₄₅₇ tiene esta vía como diana, será interesante continuar trabajando para evaluar su efecto sobre la isquemia cerebral.

4.2 Péptido TT1: interferencia de la señalización dependiente de TrkB-T1

El incremento que experimenta la expresión de TrkB-T1 en las condiciones de excitotoxicidad podría tener efectos negativos en la viabilidad neuronal, no sólo por su función como dominante negativo sino también por la acción exacerbada sobre vías de señalización propias. Se ha propuesto que, en estas condiciones, TrkB-T1 actuaría como un sensor biológico del entorno, de modo que la presencia de BDNF en el medio desencadenaría rutas de supervivencia al liberar las proteínas unidas a la pequeña secuencia intracelular específica del receptor, mientras que la ausencia de neurotrofina promovería la muerte celular (Gomes et al., 2012). La importancia de la secuencia C-terminal específica para la función de TrkB-T1 nos llevó a desarrollar un péptido Tat (TT1) que la contiene, utilizado como herramienta para interferir la asociación de esta isoforma y sus proteínas interaccionantes. Tras confirmar la entrada de TT1 en las neuronas, comprobamos que su presencia no altera la cinética de procesamiento de TrkB-FL, el silenciamiento de CREB ni el incremento en los niveles de TrkB-T1 en condiciones excitotóxicas. Por tanto, podemos sugerir que las posibles rutas de señalización de TrkB-T1 mediadas por las interacciones proteicas de su segmento C-terminal no ejercen un efecto modulador sobre el resto de mecanismos que regulan la expresión y estabilidad de las isoformas de TrkB en excitotoxicidad. Sin embargo, TT1 sí es capaz de interferir la interacción entre la isoforma truncada y una de las pocas proteínas conocidas que se une directamente a TrkB-T1, como es RhoGDI. Esta es la primera demostración de que los aminoácidos C-terminales específicos de TrkB-T1 están involucrados *in vivo* en la interacción de esta isoforma truncada con RhoGDI, en línea con lo anteriormente observado en ensayos *in vitro* (Ohira et al., 2005a). No obstante, la interacción basal TrkB-T1/RhoGDI detectada en nuestros cultivos primarios, constituidos por neuronas corticales y células de glía, fue muy modesta. Posiblemente, ello sea debido a que la proporción de la proteína RhoGDI que se une a TrkB-T1 sea muy pequeña, de forma similar a lo descrito en astrocitos donde tan sólo un 2.2% del

total de RhoGDI es capaz de interaccionar con la isoforma truncada (Ohira et al., 2005a). Por otra parte, aún falta por establecer la subpoblación celular donde tiene lugar esta interacción.

El análisis del efecto de TT1 sobre la muerte neuronal excitotóxica demuestra que este péptido tiene capacidad neuroprotectora a bajas dosis, a pesar de que se sigue produciendo un aumento neto en los niveles de TrkB-T1. El carácter neuroprotector de TT1 podría explicarse por la disociación del complejo TrkB-T1/RhoGDI, de forma análoga a la inducida en astrocitos por el BDNF (Ohira et al., 2005a), y la subsiguiente inhibición de las RhoGTPasas y algunos de sus efectores principales, como las proteínas ROCK (*Rho-associated kinases*). De hecho, la inhibición de la vía Rho/ROCK previene la muerte neuronal excitotóxica tanto *in vitro* como *in vivo* promovida por kainato (Jeon et al., 2013) o daño isquémico (Yamashita et al., 2007) y, de forma general, está siendo considerada como posible estrategia de neuroprotección para el tratamiento de éstas y otras patologías del SNC (Kubo et al., 2008). Una contradicción aparente para esta hipótesis sobre el mecanismo de TT1 es la pequeña fracción de la proteína RhoGDI que interacciona con TrkB-T1, de acuerdo a nuestros resultados y en línea a lo anteriormente observado en astrocitos (Ohira et al., 2005a). Sin embargo, dado que las Rho GTPasas participan a través de la remodelación del citoesqueleto en funciones celulares tan importantes como la proliferación, migración, elongación de neuritas o el tráfico a la membrana, se ha propuesto que existe un control muy estricto tanto para ellas como para sus proteínas reguladoras, como es el caso de RhoGDI (García-Mata et al., 2011). De acuerdo a esta propuesta, además de la pequeña fracción de RhoGDI regulada por TrkB-T1, el resto está interaccionando con proteínas de la familia ERM (formada por ezrina, radixina y moesina) (Sasaki and Takai, 1998), p75^{NTR} (Yamashita and Tohyama, 2003) u otras proteínas todavía por determinar. Por tanto, la disociación de RhoGDI consecuencia del tratamiento con TT1 podría ser relevante para la viabilidad neuronal.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, además del efecto neuroprotector descrito, el uso de altas concentraciones del péptido TT1 pueden llegar a ser tóxicas para las neuronas incluso en condiciones basales. Este efecto dual de TT1 podría reflejar la necesidad de mantener un equilibrio funcional para la vía Rho/ROCK dependiente de TrkB-T1. Sin embargo, ésta no parece ser la razón, puesto que no se observa toxicidad celular con inhibidores específicos de ROCK, como el compuesto Y27623 (Jeon et al., 2013) o el fasudil (Yamashita et al., 2007), ni con Tat-Pep5, un péptido que moviliza la RhoGDI unida a p75^{NTR} (Yamashita and Tohyama, 2003). Otra posible explicación tendría que ver con la función que TrkB-T1 ejerce en astrocitos respecto a la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares y la señalización mediada por dicho ión (Rose et al., 2003). Así, una alta concentración de péptido TT1 podría inducir un exceso de Ca²⁺ en el interior celular y esto podría conllevar la liberación de gliotransmisores, incluyendo glutamato, capaz de agravar la excitotoxicidad de las neuronas del entorno (Rossi and Volterra, 2009). Por último, los efectos del péptido TT1 podrían derivar de su similitud con el fragmento ICD de TrkB-T1 generado por la acción coordinada de metaloproteinas y γ -secretasas. De este modo, el ICD de este receptor podría cumplir alguna función, previsiblemente nuclear, relacio-

nada con la muerte neuronal durante excitotoxicidad, tal y como se ha demostrado para otras proteínas que sufren un procesamiento proteolítico similar. Entre ellas se incluyen p75^{NTR}, cuyo ICD es responsable de la translocación nuclear de NRIF (*neurotrophin receptor interacting factor*) permitiendo así la apoptosis inducida por este receptor (Kenchappa et al., 2006), o el receptor de Wnt Ryk, que genera un ICD en modelos de enfermedad de Huntington, capaz de reprimir la actividad del factor de transcripción FOXO fomentando la muerte neuronal (Tourette et al., 2014). Por lo tanto, será interesante abordar en experimentos futuros el posible papel que pueda jugar el ICD de TrkB-T1 en isquemia cerebral. En cualquiera de los casos, la toxicidad ejercida por un exceso de TT1 observada en el modelo celular no parece probable que pueda ocurrir *in vivo*, puesto que la propia difusión del péptido, así como su vida media impedirían alcanzar una concentración de péptido de rango similar en un área localizada. Es más, en los experimentos de neuroprotección realizados con TT1, a pesar de no haber obtenido resultados positivos por las razones expuestas en el epígrafe anterior, los animales tampoco experimentaron efectos negativos apreciables por la inyección con este péptido. Por ello, TT1 sigue siendo un candidato potencial para el tratamiento del ictus isquémico y otras enfermedades con un componente excitotóxico.

CONCLUSIONES

1. El receptor TrkB-FL es procesado por calpaína en excitotoxicidad e isquemia cerebral desprendiendo un fragmento intracelular de 32 kDa, que se acumula previsiblemente en el soma neuronal y cuya aparición se correlaciona con la severidad del daño isquémico.
2. El receptor TrkB-FL es también procesado por metaloproteinasas tras la sobrestimulación de los NMDARs en procesos de excitotoxicidad e isquemia cerebral, resultando en la liberación de su ectodominio al medio extracelular y generando un fragmento C-terminal de 42 kDa susceptible de ser procesado posteriormente por calpaína.
3. TrkB-T1 sufre un procesamiento secuencial en neuronas sometidas a condiciones excitotóxicas, primero por metaloproteinasas al igual que en TrkB-FL desprenden su ectodominio al medio extracelular y, a continuación, por γ -secretasas que liberan su dominio intracelular al citosol.
4. La sustitución de la secuencia 646-651 de TrkB-FL, solapante con el dominio KID, genera un receptor inactivo incapaz de fosforilarse en sus residuos Y515 y Y816, revelando dicha secuencia como un regulador importante de la actividad del receptor.
5. El receptor TrkB-FL mutante incapaz de fosforilarse es más resistente al procesamiento por calpaína, lo que sugiere que su proteólisis está regulada por fosforilación.
6. El péptido TFL₅₁₈ que contiene la secuencia específica de procesamiento por calpaína de TrkB-FL (aa 518-532) no previene la degradación proteolítica de este receptor ni la muerte neuronal en condiciones excitotóxicas.
7. El péptido TFL₄₅₇ contiene secuencias de la región yuxtamembrana de TrkB-FL (aa 457-471) y, en condiciones de excitotoxicidad, aumenta la estabilidad del receptor, así como la de otras proteínas pro supervivencia estrechamente relacionadas. Este resultado correlaciona con un potente efecto neuroprotector en situaciones de daño excitotóxico agudo o crónico.
8. El péptido TFL₄₅₇, capaz de prevenir parcialmente las acciones de calpaína y metaloproteinasas sobre TrkB-FL en excitotoxicidad, ayuda a mantener específicamente los niveles de su isoforma fosforilada en el residuo Y816. En consonancia, sus efectos sobre la supervivencia neuronal requieren el funcionamiento de la vía de PLC γ . Las vías de PI3K/Akt y MAPK/ERK, asociadas a la fosforilación de la Y515, no están implicadas en el efecto neuroprotector.

9. La interferencia de las vías de señalización de TrkB-T1 mediante un péptido que contiene la secuencia C-terminal específica de este receptor, tiene un efecto neuroprotector en excitotoxicidad.
10. Los fragmentos derivados del procesamiento de TrkB pueden ser detectados en la sangre y el LCR de modelos animales de isquemia cerebral, y en el suero de un paciente de ictus, por lo que podrían constituir nuevos biomarcadores para predecir el curso de esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarts M, Iihara K, Wei WL, Xiong ZG, Arundine M, Cerwinski W, MacDonald JF, Tymianski M (2003) A key role for TRPM7 channels in anoxic neuronal death. *Cell* 115:863-877.
- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Wang YT, Salter MW, Tymianski M (2002) Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298:846-850.
- Alderson RF, Curtis R, Alterman AL, Lindsay RM, DiStefano PS (2000) Truncated TrkB mediates the endocytosis and release of BDNF and neurotrophin-4/5 by rat astrocytes and schwann cells in vitro. *Brain Res* 871:210-222.
- Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* 389:856-860.
- Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua NU, Patel NK (2013) GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 138:155-175.
- Allendoerfer KL, Cabelli RJ, Escandon E, Kaplan DR, Nikolics K, Shatz CJ (1994) Regulation of neurotrophin receptors during the maturation of the mammalian visual system. *J Neurosci* 14:1795-1811.
- Ancot F, Foveau B, Lefebvre J, Leroy C, Tulasne D (2009) Proteolytic cleavages give receptor tyrosine kinases the gift of ubiquity. *Oncogene* 28:2185-2195.
- Arevalo JC, Conde B, Hempstead BL, Chao MV, Martin-Zanca D, Perez P (2000) TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. *Mol Cell Biol* 20:5908-5916.
- Arevalo JC, Waite J, Rajagopal R, Beyna M, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2006) Cell survival through Trk neurotrophin receptors is differentially regulated by ubiquitination. *Neuron* 50:549-559.
- Arevalo JC, Wu SH (2006) Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63:1523-1537.
- Arevalo JC, Yano H, Teng KK, Chao MV (2004) A unique pathway for sustained neurotrophin signaling through an ankyrin-rich membrane-spanning protein. *Embo J* 23:2358-2368.
- Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12:723-725.
- Bading H, Ginty DD, Greenberg ME (1993) Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* 260:181-186.
- Bahr BA, Tiriveedhi S, Park GY, Lynch G (1995) Induction of calpain-mediated spectrin fragments by pathogenic treatments in long-term hippocampal slices. *J Pharmacol Exp Ther* 273:902-908.
- Bai G, Pfaff SL (2011) Protease regulation: the Yin and Yang of neural development and disease. *Neuron* 72:9-21.
- Banerjee R, Ghosh AK, Ghosh B, Bhattacharyya S, Mondal AC (2013) Decreased mRNA and Protein Expression of BDNF, NGF, and their Receptors in the Hippocampus from Suicide: An Analysis in Human Postmortem Brain. *Clin Med Insights Pathol* 6:1-11.

- Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P (2005) Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120:275-285.
- Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25:1386-1403.
- Barbacid M (1995) Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci* 766:442-458.
- Barde I, Salmon P, Trono D (2010) Production and titration of lentiviral vectors. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 4:Unit 4 21.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1:549-553.
- Baydyuk M, Nguyen MT, Xu B (2011) Chronic deprivation of TrkB signaling leads to selective late-onset nigrostriatal dopaminergic degeneration. *Exp Neurol* 228:118-125.
- Beal MF (1998) Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 44:S110-114.
- Beattie EC, Howe CL, Wilde A, Brodsky FM, Mobley WC (2000) NGF signals through TrkA to increase clathrin at the plasma membrane and enhance clathrin-mediated membrane trafficking. *J Neurosci* 20:7325-7333.
- Beel AJ, Sanders CR (2008) Substrate specificity of gamma-secretase and other intramembrane proteases. *Cell Mol Life Sci* 65:1311-1334.
- Bell KF, Bent RJ, Meese-Tamuri S, Ali A, Forder JP, Aarts MM (2013) Calmodulin Kinase IV-dependent CREB activation is required for neuroprotection via NMDA receptor-PSD95 disruption. *Journal of neurochemistry* 126:274-287.
- Berghuis P, Dobszay MB, Wang X, Spano S, Ledda F, Sousa KM, Schulte G, Ernfors P, Mackie K, Paratcha G, Hurd YL, Harkany T (2005) Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:19115-19120.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* 7:857-866.
- Bertrand T, Kothe M, Liu J, Dupuy A, Rak A, Berne PF, Davis S, Gladysheva T, Valtre C, Crenne JY, Mathieu M (2012) The crystal structures of TrkA and TrkB suggest key regions for achieving selective inhibition. *J Mol Biol* 423:439-453.
- Bervers MB, Ingleton LP, Che D, Cole JT, Li L, Da T, Kopil CM, Cohen AS, Neumar RW (2010) RNAi targeting micro-calpain increases neuron survival and preserves hippocampal function after global brain ischemia. *Exp Neurol* 224:170-177.
- Bervers MB, Lawrence E, Maronski M, Starr N, Amesquita M, Neumar RW (2009) Knockdown of m-calpain increases survival of primary hippocampal neurons following NMDA excitotoxicity. *J Neurochem* 108:1237-1250.

- Beyers MB, Neumar RW (2008) Mechanistic role of calpains in postischemic neurodegeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:655-673.
- Bibel M, Hoppe E, Barde YA (1999) Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75^{NTR}. *Embo J* 18:616-622.
- Biffo S, Offenhauser N, Carter BD, Barde YA (1995) Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121:2461-2470.
- Bilderback TR, Gazula VR, Lisanti MP, Dobrowsky RT (1999) Caveolin interacts with Trk A and p75^{NTR} and regulates neurotrophin signaling pathways. *J Biol Chem* 274:257-263.
- Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME (1999) Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286:1358-1362.
- Borsello T, Clarke PG, Hirt L, Vercelli A, Repici M, Schorderet DF, Bogousslavsky J, Bonny C (2003) A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nature medicine* 9:1180-1186.
- Bothwell M (1995) Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18:223-253.
- Bracken BK, Turrigiano GG (2009) Experience-dependent regulation of TrkB isoforms in rodent visual cortex. *Dev Neurobiol* 69:267-278.
- Braeuninger S, Kleinschmitz C (2009) Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Experimental & translational stroke medicine* 1:8.
- Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76:99-125.
- Bratane BT, Cui H, Cook DJ, Bouley J, Tymianski M, Fisher M (2011) Neuroprotection by freezing ischemic penumbra evolution without cerebral blood flow augmentation with a postsynaptic density-95 protein inhibitor. *Stroke* 42:3265-3270.
- Bray SJ (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:678-689.
- Brorson JR, Marcuccilli CJ, Miller RJ (1995) Delayed antagonism of calpain reduces excitotoxicity in cultured neurons. *Stroke* 26:1259-1266; discussion 1267.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297-305.
- Brunoni AR, Lopes M, Fregni F (2008) A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:1169-1180.
- Caescu CI, Jeschke GR, Turk BE (2009) Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *The Biochemical journal* 424:79-88.

- Carim-Todd L, Bath KG, Fulgenzi G, Yanpallewar S, Jing D, Barrick CA, Becker J, Buckley H, Dorsey SG, Lee FS, Tessarollo L (2009) Endogenous truncated TrkB.T1 receptor regulates neuronal complexity and TrkB kinase receptor function in vivo. *J Neurosci* 29:678-685.
- Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2:396-409.
- Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA (1996) Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272:542-545.
- Castren E, Rantamaki T (2010) The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol* 70:289-297.
- Clary DO, Reichardt LF (1994) An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11133-11137.
- Cohen S, Levi-Montalcini R, Hamburger V (1954) A Nerve Growth-Stimulating Factor Isolated from Sarcom as 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40:1014-1018.
- Connor B, Young D, Lawlor P, Gai W, Waldvogel H, Faull RL, Dragunow M (1996) Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 42:1-17.
- Connor B, Young D, Yan Q, Faull RL, Synek B, Dragunow M (1997) Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 49:71-81.
- Cook DJ, Teves L, Tymianski M (2012a) A translational paradigm for the preclinical evaluation of the stroke neuroprotectant Tat-NR2B9c in gyrencephalic nonhuman primates. *Science translational medicine* 4:154ra133.
- Cook DJ, Teves L, Tymianski M (2012b) Treatment of stroke with a PSD-95 inhibitor in the gyrencephalic primate brain. *Nature* 483:213-217.
- Corbit KC, Foster DA, Rosner MR (1999) Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol Cell Biol* 19:4209-4218.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.
- Cunningham ME, Greene LA (1998) A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J* 17:7282-7293.
- Chandler LJ, Sutton G, Dorairaj NR, Norwood D (2001) N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J Biol Chem* 276:2627-2636.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.
- Chaturvedi M, Kaczmarek L (2014) Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 49:563-573.

- Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, Tsai HC, Lin JR, Chang ZF, Chen RH (2005) Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *EMBO J* 24:294-304.
- Chen da C, Wang J, Wang B, Yang SC, Zhang CX, Zheng YL, Li YL, Wang N, Yang KB, Xiu MH, Kosten TR, Zhang XY (2009) Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in drug-naive first-episode schizophrenia: relationship to clinical phenotypes. *Psychopharmacology* 207:375-380.
- Cheng A, Coksaygan T, Tang H, Khatri R, Balice-Gordon RJ, Rao MS, Mattson MP (2007) Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. *J Neurochem* 100:1515-1530.
- Chiodi V, Mallozzi C, Ferrante A, Chen JF, Lombroso PJ, Di Stasi AM, Popoli P, Domenici MR (2014) Cocaine-induced changes of synaptic transmission in the striatum are modulated by adenosine A2A receptors and involve the tyrosine phosphatase STEP. *Neuropsychopharmacology* 39:569-578.
- Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357-368.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
- Chowdary PD, Che DL, Cui B (2012) Neurotrophin signaling via long-distance axonal transport. *Annual review of physical chemistry* 63:571-594.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-27473.
- Dafer RM, Rao M, Shareef A, Sharma A (2008) Poststroke depression. *Top Stroke Rehabil* 15:13-21.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.
- Davoli E, Scip A, Cecchi M, Cimini S, Carra A, Salmona M, Borsello T (2014) Determination of tissue levels of a neuroprotectant drug: the cell permeable JNK inhibitor peptide. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 70:55-61.
- Dawbarn D, Allen SJ (2003) Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29:211-230.
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH (1991) Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6368-6371.
- De Santi L, Cantalupo L, Tassi M, Raspadori D, Cioni C, Annunziata P (2009) Higher expression of BDNF receptor gp145trkB is associated with lower apoptosis intensity in T cell lines in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 277:65-70.

- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.
- De Wit J, Eggers R, Evers R, Castren E, Verhaagen J (2006) Long-term adeno-associated viral vector-mediated expression of truncated TrkB in the adult rat facial nucleus results in motor neuron degeneration. *J Neurosci* 26:1516-1530.
- Dechant G (2001) Molecular interactions between neurotrophin receptors. *Cell and tissue research* 305:229-238.
- Dechant G, Barde YA (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 5:1131-1136.
- Dechant G, Biffo S, Okazawa H, Kolbeck R, Pottgiesser J, Barde YA (1993) Expression and binding characteristics of the BDNF receptor chick trkB. *Development* 119:545-558.
- Deisseroth K, Bito H, Tsien RW (1996) Signaling from synapse to nucleus: postsynaptic CREB phosphorylation during multiple forms of hippocampal synaptic plasticity. *Neuron* 16:89-101.
- del Zoppo GJ, Poeck K, Pessin MS, Wolpert SM, Furlan AJ, Ferbert A, Alberts MJ, Zivin JA, Wechsler L, Busse O, et al. (1992) Recombinant tissue plasminogen activator in acute thrombotic and embolic stroke. *Ann Neurol* 32:78-86.
- Deogracias R, Espliguero G, Iglesias T, Rodriguez-Pena A (2004) Expression of the neurotrophin receptor trkB is regulated by the cAMP/CREB pathway in neurons. *Mol Cell Neurosci* 26:470-480.
- Deshayes S, Morris MC, Divita G, Heitz F (2005) Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 62:1839-1849.
- Diaz-Rodriguez E, Cabrera N, Esparis-Ogando A, Montero JC, Pandiella A (1999) Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci* 11:1421-1430.
- Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Esparis-Ogando A, Yuste L, Pandiella A (2002) Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell* 13:2031-2044.
- Diering GH, Numata M (2014) Endosomal pH in neuronal signaling and synaptic transmission: role of Na(+)/H(+) exchanger NHE5. *Front Physiol* 4:412.
- Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, Konig I, Landwehr M, Kreutz M, Smalla KH, Richter K, Landgraf P, Reissner C, Boeckers TM, Zuschratter W, Spilker C, Seidenbecher CI, Garner CC, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2008) Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol* 6:e34.
- Dietz GP, Bahr M (2004) Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* 27:85-131.
- Dirnagl U (2010) Rodent models of stroke. New York, N.Y.: Humana Press.

- Dirnagl U, Becker K, Meisel A (2009) Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 8:398-412.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22:391-397.
- DiStefano PS, Chelsea DM, Schick CM, McKelvy JF (1993) Involvement of a metalloprotease in low-affinity nerve growth factor receptor truncation: inhibition of truncation in vitro and in vivo. *J Neurosci* 13:2405-2414.
- Dorsey SG, Renn CL, Carim-Todd L, Barrick CA, Bambrick L, Krueger BK, Ward CW, Tessarollo L (2006) In vivo restoration of physiological levels of truncated TrkB.T1 receptor rescues neuronal cell death in a trisomic mouse model. *Neuron* 51:21-28.
- Du W, Huang J, Yao H, Zhou K, Duan B, Wang Y (2010) Inhibition of TRPC6 degradation suppresses ischemic brain damage in rats. *The Journal of clinical investigation* 120:3480-3492.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.
- duVerle D, Takigawa I, Ono Y, Sorimachi H, Mamitsuka H (2010) CaMPDB: a resource for calpain and modulatory proteolysis. *Genome Inform* 22:202-213.
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN (2003) Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry* 60:804-815.
- Dwivedi Y, Rizavi HS, Zhang H, Mondal AC, Roberts RC, Conley RR, Pandey GN (2009) Neurotrophin receptor activation and expression in human postmortem brain: effect of suicide. *Biol Psychiatry* 65:319-328.
- Egea J, Parada E, Gomez-Rangel V, Buendia I, Negredo P, Montell E, Ruhi R, Verges J, Roda JM, Garcia AG, Lopez MG (2014) Small synthetic hyaluronan disaccharides afford neuroprotection in brain ischemia-related models. *Neuroscience* 265:313-322.
- Eggert A, Ikegaki N, Liu X, Chou TT, Lee VM, Trojanowski JQ, Brodeur GM (2000) Molecular dissection of TrkA signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 19:2043-2051.
- Eide FF, Vining ER, Eide BL, Zang K, Wang XY, Reichardt LF (1996) Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16:3123-3129.
- Emamian ES, Hall D, Birnbaum MJ, Karayiorgou M, Gogos JA (2004) Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 36:131-137.
- Ernst C, Deleva V, Deng X, Sequeira A, Pomarenski A, Klempan T, Ernst N, Quirion R, Gratton A, Szyf M, Turecki G (2009) Alternative splicing, methylation state, and expression profile of tropomyosin-related kinase B in the frontal cortex of suicide completers. *Arch Gen Psychiatry* 66:22-32.
- Fenner BM (2012) Truncated TrkB: beyond a dominant negative receptor. *Cytokine & growth factor reviews* 23:15-24.

- Fenner ME, Achim CL, Fenner BM (2014) Expression of full-length and truncated trkB in human striatum and substantia nigra neurons: implications for Parkinson's disease. *J Mol Histol* 45:349-361.
- Ferrer I, Krupinski J, Goutan E, Marti E, Ambrosio S, Arenas E (2001) Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol* 101:229-238.
- Ferrer I, Marin C, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, Tolosa E, Marti E (1999) BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:729-739.
- Ferrer I, Planas AM (2003) Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:329-339.
- Foehr ED, Lin X, O'Mahony A, Geleziunas R, Bradshaw RA, Greene WC (2000) NF-kappa B signaling promotes both cell survival and neurite process formation in nerve growth factor-stimulated PC12 cells. *J Neurosci* 20:7556-7563.
- Foerch C, Montaner J, Furie KL, Ning MM, Lo EH (2009) Invited article: searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology* 73:393-399.
- Friedman WJ, Greene LA (1999) Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res* 253:131-142.
- Fryer RH, Kaplan DR, Kromer LF (1997) Truncated trkB receptors on nonneuronal cells inhibit BDNF-induced neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 148:616-627.
- Funamoto S, Sasaki T, Ishihara S, Nobuhara M, Nakano M, Watanabe-Takahashi M, Saito T, Kakuda N, Miyasaka T, Nishikawa K, Saido TC, Ihara Y (2013) Substrate ectodomain is critical for substrate preference and inhibition of gamma-secretase. *Nature communications* 4:2529.
- Gaete JM, Bogousslavsky J (2008) Post-stroke depression. *Expert Rev Neurother* 8:75-92.
- Garcia-Mata R, Boulter E, BurrIDGE K (2011) The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:493-504.
- Gascon S, Deogracias R, Sobrado M, Roda JM, Renart J, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M (2005) Transcription of the NR1 subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor is down-regulated by excitotoxic stimulation and cerebral ischemia. *J Biol Chem* 280:35018-35027.
- Gascon S, Paez-Gomez JA, Diaz-Guerra M, Scheiffele P, Scholl FG (2008a) Dual-promoter lentiviral vectors for constitutive and regulated gene expression in neurons. *J Neurosci Methods* 168:104-112.
- Gascon S, Sobrado M, Roda JM, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M (2008b) Excitotoxicity and focal cerebral ischemia induce truncation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor and cleavage of the scaffolding protein PSD-95. *Mol Psychiatry* 13:99-114.
- Gauthier LR, Charrin BC, Borrell-Pages M, Dompierre JP, Rangone H, Cordelieres FP, De Mey J, MacDonald ME, Lessmann V, Humbert S, Saudou F (2004) Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. *Cell* 118:127-138.

- Geetha T, Jiang J, Wooten MW (2005) Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor TrkA directs internalization and signaling. *Mol Cell* 20:301-312.
- Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441-466.
- Gines S, Paoletti P, Alberch J (2010) Impaired TrkB-mediated ERK1/2 activation in huntington disease knock-in striatal cells involves reduced p52/p46 Shc expression. *J Biol Chem* 285:21537-21548.
- Ginsberg MD (2003) Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 34:214-223.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiol Rev* 83:731-801.
- Gomes JR, Costa JT, Melo CV, Felizzi F, Monteiro P, Pinto MJ, Inacio AR, Wieloch T, Almeida RD, Graos M, Duarte CB (2012) Excitotoxicity downregulates TrkB.FL signaling and upregulates the neuroprotective truncated TrkB receptors in cultured hippocampal and striatal neurons. *J Neurosci* 32:4610-4622.
- Gonsette RE (2008) Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neurol Sci* 274:48-53.
- Gooz M (2010) ADAM-17: the enzyme that does it all. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 45:146-169.
- Grimes ML, Beattie E, Mobley WC (1997) A signaling organelle containing the nerve growth factor-activated receptor tyrosine kinase, TrkA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9909-9914.
- Grimes ML, Zhou J, Beattie EC, Yuen EC, Hall DE, Valletta JS, Topp KS, LaVail JH, Bunnett NW, Mobley WC (1996) Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* 16:7950-7964.
- Grotta JC, Chiu D, Lu M, Patel S, Levine SR, Tilley BC, Brott TG, Haley EC, Jr., Lyden PD, Kothari R, Frankel M, Lewandowski CA, Libman R, Kwiatkowski T, Broderick JP, Marler JR, Corrigan J, Huff S, Mitsias P, Talati S, Tanne D (1999) Agreement and variability in the interpretation of early CT changes in stroke patients qualifying for intravenous rtPA therapy. *Stroke* 30:1528-1533.
- Group TNt-PSS (1997) Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. *Stroke* 28:2109-2118.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297:1186-1190.
- Guiton M, Gunn-Moore FJ, Stitt TN, Yancopoulos GD, Tavaré JM (1994) Identification of in vivo brain-derived neurotrophic factor-stimulated autophosphorylation sites on the TrkB receptor tyrosine kinase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269:30370-30377.
- Guo S, Peng M, Zhao Q, Zhang W (2012) Role of ADAM10 and ADAM17 in CD16b shedding mediated by different stimulators. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences* 27:73-79.

- Gupta VK, You Y, Klistorner A, Graham SL (2012) Shp-2 regulates the TrkB receptor activity in the retinal ganglion cells under glaucomatous stress. *Biochim Biophys Acta* 1822:1643-1649.
- Haapasalo A, Koponen E, Hoppe E, Wong G, Castren E (2001) Truncated trkB.T1 is dominant negative inhibitor of trkB.TK+-mediated cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1352-1358.
- Haglund K, Di Fiore PP, Dikic I (2003) Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28:598-603.
- Hajimohammadreza I, Raser KJ, Nath R, Nadimpalli R, Scott M, Wang KK (1997) Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase IIalpha undergo neurotoxin-induced proteolysis. *J Neurochem* 69:1006-1013.
- Haniu M, Talvenheimo J, Le J, Katta V, Welcher A, Rohde MF (1995) Extracellular domain of neurotrophin receptor trkB: disulfide structure, N-glycosylation sites, and ligand binding. *Arch Biochem Biophys* 322:256-264.
- Hansen AJ, Nedergaard M (1988) Brain ion homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochemical pathology* 9:195-209.
- Hardingham GE, Bading H (2002) Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta* 1600:148-153.
- Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* 26:81-89.
- Hardingham GE, Bading H (2010) Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nature reviews Neuroscience* 11:682-696.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-414.
- Harris B, Pereira I, Parkin E (2009) Targeting ADAM10 to lipid rafts in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 1296:203-215.
- Hartley DM, Choi DW (1989) Delayed rescue of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* 250:752-758.
- Hartley DM, Kurth MC, Bjerkness L, Weiss JH, Choi DW (1993) Glutamate receptor-induced 45Ca^{2+} accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *J Neurosci* 13:1993-2000.
- Hartmann M, Brigadski T, Erdmann KS, Holtmann B, Sendtner M, Narz F, Lessmann V (2004) Truncated TrkB receptor-induced outgrowth of dendritic filopodia involves the p75 neurotrophin receptor. *J Cell Sci* 117:5803-5814.
- Hartmann M, Herrlich A, Herrlich P (2013) Who decides when to cleave an ectodomain? *Trends in biochemical sciences* 38:111-120.
- He XL, Garcia KC (2004) Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. *Science* 304:870-875.

- Hemming ML, Elias JE, Gygi SP, Selkoe DJ (2008) Proteomic profiling of gamma-secretase substrates and mapping of substrate requirements. *PLoS Biol* 6:e257.
- Hempstead BL, Martin-Zanca D, Kaplan DR, Parada LF, Chao MV (1991) High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. *Nature* 350:678-683.
- Hill MD, Martin RH, Mikulis D, Wong JH, Silver FL, Terbrugge KG, Milot G, Clark WM, Macdonald RL, Kelly ME, Boulton M, Fleetwood I, McDougall C, Gunnarsson T, Chow M, Lum C, Dodd R, Poublanc J, Krings T, Demchuk AM, Goyal M, Anderson R, Bishop J, Garman D, Tymianski M, investigators Et (2012) Safety and efficacy of NA-1 in patients with iatrogenic stroke after endovascular aneurysm repair (ENACT): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 11:942-950.
- Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* 344:339-341.
- Holden PH, Asopa V, Robertson AG, Clarke AR, Tyler S, Bennett GS, Brain SD, Wilcock GK, Allen SJ, Smith SK, Dawbarn D (1997) Immunoglobulin-like domains define the nerve growth factor binding site of the TrkA receptor. *Nat Biotechnol* 15:668-672.
- Hong SC, Lanzino G, Goto Y, Kang SK, Schottler F, Kassell NF, Lee KS (1994) Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia. *Brain Res* 661:43-50.
- Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I (2005) Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res* 1037:204-208.
- Hossain MI, Roulston CL, Kamaruddin MA, Chu PW, Ng DC, Dusting GJ, Bjorge JD, Williamson NA, Fujita DJ, Cheung SN, Chan TO, Hill AF, Cheng HC (2013) A truncated fragment of Src protein kinase generated by calpain-mediated cleavage is a mediator of neuronal death in excitotoxicity. *J Biol Chem* 288:9696-9709.
- Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA (2000) Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol* 166:127-135.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Huang SH, Wang J, Sui WH, Chen B, Zhang XY, Yan J, Geng Z, Chen ZY (2013) BDNF-dependent recycling facilitates TrkB translocation to postsynaptic density during LTP via a Rab11-dependent pathway. *J Neurosci* 33:9214-9230.
- Huang SH, Zhao L, Sun ZP, Li XZ, Geng Z, Zhang KD, Chao MV, Chen ZY (2009) Essential role of Hrs in endocytic recycling of full-length TrkB receptor but not its isoform TrkB.T1. *J Biol Chem* 284:15126-15136.
- Huang YZ, McNamara JO (2010) Mutual regulation of Src family kinases and the neurotrophin receptor TrkB. *J Biol Chem* 285:8207-8217.
- Huang YZ, Pan E, Xiong ZQ, McNamara JO (2008) Zinc-mediated transactivation of TrkB potentiates the hippocampal mossy fiber-CA3 pyramid synapse. *Neuron* 57:546-558.

- Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA (1994) Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265:1883-1885.
- Huovila A-PJP, Turner AJ, Peltö-Huikko M, Kärkkäinen I, Ortiz RM (2005) Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in biochemical sciences* 30:413-422.
- Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3:661-669.
- Hutagalung AH, Novick PJ (2011) Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiol Rev* 91:119-149.
- Hynd MR, Scott HL, Dodd PR (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 45:583-595.
- Ikonomidou C, Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1:383-386.
- Issa G, Wilson C, Terry AV, Jr., Pillai A (2010) An inverse relationship between cortisol and BDNF levels in schizophrenia: data from human postmortem and animal studies. *Neurobiol Dis* 39:327-333.
- Ivanov A, Pellegrino C, Rama S, Dumalska I, Salyha Y, Ben-Ari Y, Medina I (2006) Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regulation of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. *J Physiol* 572:789-798.
- Iwakura Y, Nawa H, Sora I, Chao MV (2008) Dopamine D1 receptor-induced signaling through TrkB receptors in striatal neurons. *J Biol Chem* 283:15799-15806.
- Jadhav TS, Wooten MW, Wooten MC (2011) Mining the TRAF6/p62 interactome for a selective ubiquitination motif. *BMC proceedings* 5 Suppl 2:S4.
- Jang HJ, Yang YR, Kim JK, Choi JH, Seo YK, Lee YH, Lee JE, Ryu SH, Suh PG (2013) Phospholipase C-gamma1 involved in brain disorders. *Adv Biol Regul* 53:51-62.
- Jang SW, Liu X, Yepes M, Shepherd KR, Miller GW, Liu Y, Wilson WD, Xiao G, Blanchi B, Sun YE, Ye K (2010) A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2687-2692.
- Jeanneteau F, Garabedian MJ, Chao MV (2008) Activation of Trk neurotrophin receptors by glucocorticoids provides a neuroprotective effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4862-4867.
- Jeon BT, Jeong EA, Park SY, Son H, Shin HJ, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho GJ, Choi WS, Roh GS (2013) The Rho-kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 protects against excitotoxicity-induced neuronal death in vivo and in vitro. *Neurotoxicity research* 23:238-248.
- Jeronimo-Santos A, Vaz SH, Parreira S, Rapaz-Lerías S, Caetano AP, Buee-Scherrer V, Castren E, Valente CA, Blum D, Sebastiao AM, Diogenes MJ (2014) Dysregulation of TrkB Receptors and BDNF Function by Amyloid-beta Peptide is Mediated by Calpain. *Cereb Cortex*.
- Ji Y, Pang PT, Feng L, Lu B (2005) Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 8:164-172.

- Jickling GC, Sharp FR (2011) Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 8:349-360.
- Jin N, Qian W, Yin X, Zhang L, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX, Liu F (2013) CREB regulates the expression of neuronal glucose transporter 3: a possible mechanism related to impaired brain glucose uptake in Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res* 41:3240-3256.
- Jing S, Tapley P, Barbacid M (1992) Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors. *Neuron* 9:1067-1079.
- Jourquin J, Tremblay E, Decanis N, Charton G, Hanessian S, Chollet A-M, Le Diguandher T, Khrestchatsky M, Rivera S (2003) Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *European Journal of Neuroscience* 18:1507-1517.
- Kao S, Jaiswal RK, Kolch W, Landreth GE (2001) Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J Biol Chem* 276:18169-18177.
- Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF (1991a) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252:554-558.
- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF (1991b) Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350:158-160.
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391.
- Karpova A, Mikhaylova M, Bera S, Bar J, Reddy PP, Behnisch T, Rankovic V, Spilker C, Bethge P, Sahin J, Kaushik R, Zuschratter W, Kahne T, Naumann M, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2013) Encoding and transducing the synaptic or extrasynaptic origin of NMDA receptor signals to the nucleus. *Cell* 152:1119-1133.
- Kemppainen S, Rantamäki T, Jerónimo-Santos A, Lavasseur G, Autio H, Karpova N, Kärkkäinen E, Stavén S, Vicente Miranda H, Outeiro TF, Diógenes MJ, Laroche S, Davis S, Sebastião AM, Castrén E, Tanila H (2012) Impaired TrkB receptor signaling contributes to memory impairment in APP/PS1 mice. *Neurobiology of aging* 33:39.
- Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, Barker PA, Teng HK, Hempstead BL, Carter BD (2006) Ligand-dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons. *Neuron* 50:219-232.
- Kermani P, Hempstead B (2007) Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 17:140-143.
- Keum S, Marchuk DA (2009) A locus mapping to mouse chromosome 7 determines infarct volume in a mouse model of ischemic stroke. *Circulation Cardiovascular genetics* 2:591-598.
- Kim JM, Stewart R, Kim SW, Yang SJ, Shin IS, Kim YH, Yoon JS (2007) Interactions between life stressors and susceptibility genes (5-HTTLPR and BDNF) on depression in Korean elders. *Biol Psychiatry* 62:423-428.

- Kiris E, Wang T, Yanpallear S, Dorsey SG, Becker J, Bavari S, Palko ME, Coppola V, Tessarollo L (2014) TrkA in vivo function is negatively regulated by ubiquitination. *J Neurosci* 34:4090-4098.
- Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M (1991) The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65:189-197.
- Knusel B, Rabin SJ, Hefti F, Kaplan DR (1994) Regulated neurotrophin receptor responsiveness during neuronal migration and early differentiation. *J Neurosci* 14:1542-1554.
- Koistinaho M, Malm TM, Kettunen MI, Goldsteins G, Starckx S, Kauppinen RA, Opdenakker G, Koistinaho J (2005) Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:460-467.
- Kojima S, Nakayama T, Kuwajima G, Suzuki H, Sakata T (1999) TrkB mutant lacking the amino-terminal half of the extracellular portion acts as a functional brain-derived neurotrophic factor receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1420:104-110.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F (2001) Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5815-5820.
- Kommaddi RP, Thomas R, Ceni C, Daigneault K, Barker PA (2011) Trk-dependent ADAM17 activation facilitates neurotrophin survival signaling. *FASEB J* 25:2061-2070.
- Kopan R, Ilagan MX (2004) Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:499-504.
- Koponen E, Voikar V, Riekkilä R, Saarelainen T, Rauramaa T, Rauvala H, Taira T, Castren E (2004) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci* 26:166-181.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 269:1737-1740.
- Kouroku Y, Urase K, Fujita E, Isahara K, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Momoi MY, Momoi T (1998) Detection of activated Caspase-3 by a cleavage site-directed antiserum during naturally occurring DRG neurons apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 247:780-784.
- Koutsilieri E, Riederer P (2007) Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 13 Suppl 3:S329-331.
- Kubo T, Yamaguchi A, Iwata N, Yamashita T (2008) The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Therapeutics and clinical risk management* 4:605-615.
- Lai TW, Shyu W-CC, Wang YT (2011) Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond. *Trends in molecular medicine* 17:266-275.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology* 115C:157-188.
- Lal M, Caplan M (2011) Regulated intramembrane proteolysis: signaling pathways and biological functions. *Physiology* 26:34-44.

- Lazo OM, Gonzalez A, Ascano M, Kuruvilla R, Couve A, Bronfman FC (2013) BDNF regulates Rab11-mediated recycling endosome dynamics to induce dendritic branching. *J Neurosci* 33:6112-6122.
- Lee FS, Chao MV (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3555-3560.
- Lee FS, Rajagopal R, Chao MV (2002) Distinctive features of Trk neurotrophin receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:11-17.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294:1945-1948.
- Leist M, Nicotera P (1998) Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 239:183-201.
- Leveille F, El Gaamouch F, Gouix E, Lecocq M, Lobner D, Nicole O, Buisson A (2008) Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *Faseb J* 22:4258-4271.
- Levi-Montalcini R, Hamburger V (1951) Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of experimental zoology* 116:321-361.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ (1995) Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 15:7810-7820.
- Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19:289-317.
- Li X, Valencia A, Sapp E, Masso N, Alexander J, Reeves P, Kegel KB, Aronin N, Difiglia M (2010) Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci* 30:4552-4561.
- Liang Z, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX (2007) Down-regulation of cAMP-dependent protein kinase by over-activated calpain in Alzheimer disease brain. *J Neurochem* 103:2462-2470.
- Lichtenthaler SF, Haass C, Steiner H (2011) Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J Neurochem* 117:779-796.
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibanez CF (1997) NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 16:4999-5005.
- Liot G, Zala D, Pla P, Mottet G, Piel M, Saudou F (2013) Mutant Huntingtin alters retrograde transport of TrkB receptors in striatal dendrites. *J Neurosci* 33:6298-6309.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632.
- Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS (1999) Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res* 27:2086-2090.

- Liu Z, Cao J, Gao X, Ma Q, Ren J, Xue Y (2011) GPS-CCD: a novel computational program for the prediction of calpain cleavage sites. *PLoS One* 6:e19001.
- Lizee G, Aerts JL, Gonzales MI, Chinnasamy N, Morgan RA, Topalian SL (2003) Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum Gene Ther* 14:497-507.
- Locascio LE, Donoghue DJ (2013) KIDs rule: regulatory phosphorylation of RTKs. *Trends Biochem Sci* 38:75-84.
- Lochhead JJ, Thorne RG (2012) Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Advanced drug delivery reviews* 64:614-628.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295:868-872.
- Lopez-Menendez C, Gamir-Morralla A, Jurado-Arjona J, Higuero AM, Campanero MR, Ferrer I, Hernandez F, Avila J, Diaz-Guerra M, Iglesias T (2013) Kidins220 accumulates with tau in human Alzheimer's disease and related models: modulation of its calpain-processing by GSK3beta/PP1 imbalance. *Hum Mol Genet* 22:466-482.
- Lopez-Menendez C, Gascon S, Sobrado M, Vidaurre OG, Higuero AM, Rodriguez-Pena A, Iglesias T, Diaz-Guerra M (2009) Kidins220/ARMS downregulation by excitotoxic activation of NMDARs reveals its involvement in neuronal survival and death pathways. *J Cell Sci* 122:3554-3565.
- Lopez-Valdes HE, Clarkson AN, Ao Y, Charles AC, Carmichael ST, Sofroniew MV, Brennan KC (2014) Memantine enhances recovery from stroke. *Stroke* 45:2093-2100.
- Lorrio S, Gomez-Rangel V, Negredo P, Egea J, Leon R, Romero A, Dal-Cim T, Villarroja M, Rodriguez-Franco MI, Conde S, Arce MP, Roda JM, Garcia AG, Lopez MG (2013) Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in in vitro and in vivo models related to brain ischemia. *Neuropharmacology* 67:403-411.
- Lu J, Wu Y, Sousa N, Almeida OF (2005) SMAD pathway mediation of BDNF and TGF beta 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development* 132:3231-3242.
- Lu W, Man H, Ju W, Trimble WS, MacDonald JF, Wang YT (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29:243-254.
- Luberg K, Wong J, Weickert CS, Timmusk T (2010) Human TrkB gene: novel alternative transcripts, protein isoforms and expression pattern in the prefrontal cerebral cortex during postnatal development. *J Neurochem* 113:952-964.
- Ma S, Liu S, Huang Q, Xie B, Lai B, Wang C, Song B, Li M (2012) Site-specific phosphorylation protects glycogen synthase kinase-3beta from calpain-mediated truncation of its N and C termini. *J Biol Chem* 287:22521-22532.
- Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hempstead BL (1994) High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors. *J Biol Chem* 269:6884-6891.

- Manabe S, Gu Z, Lipton SA (2005) Activation of matrix metalloproteinase-9 via neuronal nitric oxide synthase contributes to NMDA-induced retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:4747-4753.
- Mariga A, Zavadi J, Ginsberg SD, Chao MV (2014) Withdrawal of BDNF from hippocampal cultures leads to changes in genes involved in synaptic function. *Dev Neurobiol*.
- Markus R, Reutens DC, Kazui S, Read S, Wright P, Chambers BR, Sachinidis JI, Tochon-Danguy HJ, Donnan GA (2003) Topography and temporal evolution of hypoxic viable tissue identified by 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography in humans after ischemic stroke. *Stroke* 34:2646-2652.
- Martel MA, Ryan TJ, Bell KF, Fowler JH, McMahon A, Al-Mubarak B, Komiyama NH, Horsburgh K, Kind PC, Grant SG, Wyllie DJ, Hardingham GE (2012) The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults. *Neuron* 74:543-556.
- Martel MA, Soriano FX, Baxter P, Rickman C, Duncan R, Wyllie DJ, Hardingham GE (2009a) Inhibiting pro-death NMDA receptor signaling dependent on the NR2 PDZ ligand may not affect synaptic function or synaptic NMDA receptor signaling to gene expression. *Channels (Austin)* 3:12-15.
- Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE (2009b) In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* 158:334-343.
- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17:251-257.
- Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, Ishii K, Moriishi K, Robison CS, Whitt MA, Miyamura T (2001) Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 286:263-275.
- Maussion G, Yang J, Yerko V, Barker P, Mechawar N, Ernst C, Turecki G (2012) Regulation of a truncated form of tropomyosin-related kinase B (TrkB) by Hsa-miR-185* in frontal cortex of suicide completers. *PloS one* 7.
- Meakin SO, MacDonald JI, Gryz EA, Kubu CJ, Verdi JM (1999) The signaling adapter FRS-2 competes with Shc for binding to the nerve growth factor receptor TrkA. A model for discriminating proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 274:9861-9870.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698:6-18.
- Meldrum BS (1993) Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol* 3:405-412.
- Mellgren RL (1980) Canine cardiac calcium-dependent proteases: Resolution of two forms with different requirements for calcium. *FEBS Lett* 109:129-133.
- Michaelson K, Zagrebelsky M, Berndt-Huch J, Polack M, Buschler A, Sendtner M, Korte M (2010) Neurotrophin receptors TrkB.T1 and p75(NTR) cooperate in modulating both functional and structural plasticity in mature hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 32:1854-1865.
- Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T (1991) trkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol* 11:143-153.

- Middlemas DS, Meisenhelder J, Hunter T (1994) Identification of TrkB autophosphorylation sites and evidence that phospholipase C-gamma 1 is a substrate of the TrkB receptor. *J Biol Chem* 269:5458-5466.
- Mihalikova A, Baliova M, Jursky F (2014) Effect of phosphomimetic mutations on the C-terminal sensitivity of glycine transporter GlyT1 to calpain. *Neurosci Res* 81-82:85-91.
- Minichiello L (2009) TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci* 10:850-860.
- Minichiello L, Calella AM, Medina DL, Bonhoeffer T, Klein R, Korte M (2002) Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 36:121-137.
- Moranco A, Garcia-Bonilla L, Barcelo V, Giralt D, Campos-Martorell M, Garcia S, Montaner J, Rosell A (2012) A new method for focal transient cerebral ischaemia by distal compression of the middle cerebral artery. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38:617-627.
- Moranco A, Rosell A, Garcia-Bonilla L, Montaner J (2010) Metalloproteinase and stroke infarct size: role for anti-inflammatory treatment? *Ann N Y Acad Sci* 1207:123-133.
- Mort JS, Buttle DJ (1999) The use of cleavage site specific antibodies to delineate protein processing and breakdown pathways. *Molecular pathology* : MP 52:11-18.
- Moustafa RR, Baron JC (2008) Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S44-54.
- Nagano O, Murakami D, Hartmann D, De Strooper B, Saftig P, Iwatsubo T, Nakajima M, Shinohara M, Saya H (2004) Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation. *J Cell Biol* 165:893-902.
- Nair S, Hagberg H, Krishnamurthy R, Thornton C, Mallard C (2013) Death associated protein kinases: molecular structure and brain injury. *International journal of molecular sciences* 14:13858-13872.
- Navaratna D, Fan X, Leung W, Lok J, Guo S, Xing C, Wang X, Lo EH (2013) Cerebrovascular degradation of TRKB by MMP9 in the diabetic brain. *J Clin Invest* 123:3373-3377.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Nedrełow JH, Cianci CD, Morrow JS (2003) c-Src binds alpha II spectrin's Src homology 3 (SH3) domain and blocks calpain susceptibility by phosphorylating Tyr1176. *J Biol Chem* 278:7735-7741.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron* 34:13-25.
- Nguyen PV, Abel T, Kandel ER (1994) Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science* 265:1104-1107.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS (1995) Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 15:7539-7547.

- Nicolas G, Fournier CM, Galand C, Malbert-Colas L, Bournier O, Kroviarski Y, Bourgeois M, Camonis JH, Dhermy D, Grandchamp B, Lecomte MC (2002) Tyrosine phosphorylation regulates alpha II spectrin cleavage by calpain. *Mol Cell Biol* 22:3527-3536.
- Ning K, Pei L, Liao M, Liu B, Zhang Y, Jiang W, Mielke JG, Li L, Chen Y, El-Hayek YH, Fehlings MG, Zhang X, Liu F, Eubanks J, Wan Q (2004) Dual neuroprotective signaling mediated by downregulating two distinct phosphatase activities of PTEN. *J Neurosci* 24:4052-4060.
- Nykjaer A, Willnow TE, Petersen CM (2005) p75^{NTR}--live or let die. *Curr Opin Neurobiol* 15:49-57.
- Obermeier A, Halfter H, Wiesmuller KH, Jung G, Schlessinger J, Ullrich A (1993) Tyrosine 785 is a major determinant of Trk--substrate interaction. *EMBO J* 12:933-941.
- Ochs G, Penn RD, York M, Giess R, Beck M, Tonn J, Haigh J, Malta E, Traub M, Sendtner M, Toyka KV (2000) A phase I/II trial of recombinant methionyl human brain derived neurotrophic factor administered by intrathecal infusion to patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron disorders : official publication of the World Federation of Neurology, Research Group on Motor Neuron Diseases* 1:201-206.
- Offenhauser N, Muzio V, Biffo S (2002) BDNF binding to truncated trkB.T1 does not affect gene expression. *Neuroreport* 13:1189-1193.
- Ohira K, Funatsu N, Homma KJ, Sahara Y, Hayashi M, Kaneko T, Nakamura S (2007) Truncated TrkB-T1 regulates the morphology of neocortical layer I astrocytes in adult rat brain slices. *Eur J Neurosci* 25:406-416.
- Ohira K, Hayashi M (2003) Expression of TrkB subtypes in the adult monkey cerebellar cortex. *J Chem Neuroanat* 25:175-183.
- Ohira K, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M (2006) TrkB-T1 regulates the RhoA signaling and actin cytoskeleton in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342:867-874.
- Ohira K, Kumanogoh H, Sahara Y, Homma KJ, Hirai H, Nakamura S, Hayashi M (2005a) A truncated tropomyosin-related kinase B receptor, T1, regulates glial cell morphology via Rho GDP dissociation inhibitor 1. *J Neurosci* 25:1343-1353.
- Ohira K, Shimizu K, Hayashi M (1999) Change of expression of full-length and truncated TrkB in the developing monkey central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 112:21-29.
- Ohira K, Shimizu K, Yamashita A, Hayashi M (2005b) Differential expression of the truncated TrkB receptor, T1, in the primary motor and prefrontal cortices of the adult macaque monkey. *Neurosci Lett* 385:105-109.
- Olney JW (1986) Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203:631-645.
- Pandya C, Kutianawalla A, Turecki G, Pillai A (2014) Glucocorticoid regulates TrkB protein levels via c-Cbl dependent ubiquitination: a decrease in c-Cbl mRNA in the prefrontal cortex of suicide subjects. *Psychoneuroendocrinology* 45:108-118.
- Papadia S, Soriano FX, Leveille F, Martel MA, Dakin KA, Hansen HH, Kaindl A, Siffringer M, Fowler J, Stefovskaja V, McKenzie G, Craigmiles M, Corriveau R, Ghazal P, Horsburgh K, Yankner BA, Wyllie DJ, Ikonomidou C, Hardingham GE (2008) Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat Neurosci* 11:476-487.

- Papouin T, Ladépêche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet J-PP, Oliet SH (2012) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150:633-646.
- Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R (1999) Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport* 10:557-561.
- Park JS, Bateman MC, Goldberg MP (1996) Rapid alterations in dendrite morphology during sublethal hypoxia or glutamate receptor activation. *Neurobiol Dis* 3:215-227.
- Park SH, Kim JH, Park SJ, Bae SS, Choi YW, Hong JW, Choi BT, Shin HK (2011) Protective effect of hexane extracts of *Uncaria sinensis* against photothrombotic ischemic injury in mice. *Journal of ethnopharmacology* 138:774-779.
- Peiro S, Comella JX, Enrich C, Martin-Zanca D, Rocamora N (2000) PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *J Biol Chem* 275:37846-37852.
- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnstock M (2005) Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 93:1412-1421.
- Peng X, Greene LA, Kaplan DR, Stephens RM (1995) Deletion of a conserved juxtamembrane sequence in Trk abolishes NGF-promoted neuritogenesis. *Neuron* 15:395-406.
- Pereira DB, Rebola N, Rodrigues RJ, Cunha RA, Carvalho AP, Duarte CB (2006) Trkb receptors modulation of glutamate release is limited to a subset of nerve terminals in the adult rat hippocampus. *J Neurosci Res* 83:832-844.
- Pevsner PH, Eichenbaum JW, Miller DC, Pivawer G, Eichenbaum KD, Stern A, Zakian KL, Koutcher JA (2001) A photothrombotic model of small early ischemic infarcts in the rat brain with histologic and MRI correlation. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 45:227-233.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2140-2145.
- Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW (1991) BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 7:695-702.
- Pitt D, Werner P, Raine CS (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6:67-70.
- Plotkin JL, Day M, Peterson JD, Xie Z, Kress GJ, Rafalovich I, Kondapalli J, Gertler TS, Flajolet M, Greengard P, Stavarache M, Kaplitt MG, Rosinski J, Chan CS, Surmeier DJ (2014) Impaired TrkB Receptor Signaling Underlies Corticostriatal Dysfunction in Huntington's Disease. *Neuron* 83:178-188.
- Poon WW, Blurton-Jones M, Tu CH, Feinberg LM, Chabrier MA, Harris JW, Jeon NL, Cotman CW (2011) beta-Amyloid impairs axonal BDNF retrograde trafficking. *Neurobiol Aging* 32:821-833.

- Puehringer D, Orel N, Lüningschrör P, Subramanian N, Herrmann T, Chao MV, Sendtner M (2013) EGF transactivation of Trk receptors regulates the migration of newborn cortical neurons. *Nature neuroscience* 16:407-415.
- Rajagopal R, Chao MV (2006) A role for Fyn in Trk receptor transactivation by G-protein-coupled receptor signaling. *Mol Cell Neurosci* 33:36-46.
- Rajagopal R, Chen ZY, Lee FS, Chao MV (2004) Transactivation of Trk neurotrophin receptors by G-protein-coupled receptor ligands occurs on intracellular membranes. *J Neurosci* 24:6650-6658.
- Rami A, Ferger D, Kriegstein J (1997) Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res* 27:93-97.
- Rantamäki T, Hendolin P, Kankaanpää A, Mijatovic J, Piepponen P, Domenici E, Chao MV, Mannisto PT, Castren E (2007) Pharmacologically diverse antidepressants rapidly activate brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB and induce phospholipase-Cgamma signaling pathways in mouse brain. *Neuropsychopharmacology* 32:2152-2162.
- Rantamäki T, Vesa L, Anttila H, Di Lieto A, Tammela P, Schmitt A, Lesch KP, Rios M, Castren E (2011) Antidepressant drugs transactivate TrkB neurotrophin receptors in the adult rodent brain independently of BDNF and monoamine transporter blockade. *PLoS One* 6:e20567.
- Ray MT, Shannon Weickert C, Webster MJ (2014) Decreased BDNF and TrkB mRNA expression in multiple cortical areas of patients with schizophrenia and mood disorders. *Transl Psychiatry* 4:e389.
- Reichardt LF (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Rhim T, Lee DY, Lee M (2013) Drug delivery systems for the treatment of ischemic stroke. *Pharmaceutical research* 30:2429-2444.
- Rivera S, Khrestchatsky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM (2010) Met zincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci* 30:15337-15357.
- Rose CR, Blum R, Pichler B, Lepier A, Kaftitz KW, Konnerth A (2003) Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signalling in glia cells. *Nature* 426:74-78.
- Rose K, Goldberg MP, Choi DW (1993) Cytotoxicity in murine neocortical cell culture. *Methods Toxicol* 1A:46-60.
- Rosenberg GA (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *The Lancet Neurology*.
- Rossi D, Volterra A (2009) Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull* 80:224-232.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Rothman SM, Olney JW (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19:105-111.

- Roux PP, Barker PA (2002) Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67:203-233.
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401-406.
- Rusanescu G, Yang W, Bai A, Neel BG, Feig LA (2005) Tyrosine phosphatase SHP-2 is a mediator of activity-dependent neuronal excitotoxicity. *EMBO J* 24:305-314.
- Saarelainen T, Lukkarinen JA, Koponen S, Gröhn OH, Jolkkonen J, Koponen E, Haapasalo A, Alhonen L, Wong G, Koistinaho J, Kauppinen RA, Castrén E (2000) Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Molecular and cellular neurosciences* 16:87-96.
- Saftig P, Reiss K (2011) The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *European journal of cell biology* 90:527-535.
- Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW (2013) Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist* 19:62-75.
- Sasaki T, Takai Y (1998) The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Biochem Biophys Res Commun* 245:641-645.
- Sastry L, Johnson T, Hobson MJ, Smucker B, Cornetta K (2002) Titering lentiviral vectors: comparison of DNA, RNA and marker expression methods. *Gene Ther* 9:1155-1162.
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284:1845-1848.
- Schneider R, Schweiger M (1991) A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosine kinase receptors. *Oncogene* 6:1807-1811.
- Schroeter M, Jander S, Stoll G (2002) Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *Journal of neuroscience methods* 117:43-49.
- Schuhmann B, Dietrich A, Sel S, Hahn C, Klingenspor M, Lommatzsch M, Gudermann T, Braun A, Renz H, Nockher WA (2005) A role for brain-derived neurotrophic factor in B cell development. *J Neuroimmunol* 163:15-23.
- Schwaninger M, Inta I, Herrmann O (2006) NF-kappaB signalling in cerebral ischaemia. *Biochem Soc Trans* 34:1291-1294.
- Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Savaria D, Hamelin J, Goulet B, Laliberte J, Lazure C, Chretien M, Murphy RA (1996) Cellular processing of the nerve growth factor precursor by the mammalian pro-protein convertases. *Biochem J* 314 (Pt 3):951-960.
- Sen S, Duman R, Sanacora G (2008) Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry* 64:527-532.

- Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-861.
- Shelton DL, Sutherland J, Gripp J, Camerato T, Armanini MP, Phillips HS, Carroll K, Spencer SD, Levinson AD (1995) Human trks: molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins. *J Neurosci* 15:477-491.
- Shen J, Maruyama IN (2011) Nerve growth factor receptor TrkA exists as a preformed, yet inactive, dimer in living cells. *FEBS Lett* 585:295-299.
- Shen J, Maruyama IN (2012) Brain-derived neurotrophic factor receptor TrkB exists as a preformed dimer in living cells. *Journal of molecular signaling* 7:2.
- Silhol M, Bonnichon V, Rage F, Tapia-Arancibia L (2005) Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132:613-624.
- Siman R, McIntosh TK, Soltesz KM, Chen Z, Neumar RW, Roberts VL (2004) Proteins released from degenerating neurons are surrogate markers for acute brain damage. *Neurobiol Dis* 16:311-320.
- Siman R, Noszek JC (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1:279-287.
- Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM (1997) Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav* 56:131-137.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM (1995) Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 771:234-239.
- Soriano FX, Martel MA, Papadia S, Vaslin A, Baxter P, Rickman C, Forder J, Tymianski M, Duncan R, Aarts M, Clarke P, Wyllie DJ, Hardingham GE (2008) Specific targeting of pro-death NMDA receptor signals with differing reliance on the NR2B PDZ ligand. *J Neurosci* 28:10696-10710.
- Stabach PR, Cianci CD, Glantz SB, Zhang Z, Morrow JS (1997) Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. *Biochemistry* 36:57-65.
- Stavropoulos I, Khaldi N, Davey NE, O'Brien K, Martin F, Shields DC (2012) Protein disorder and short conserved motifs in disordered regions are enriched near the cytoplasmic side of single-pass transmembrane proteins. *PLoS One* 7:e44389.
- Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:513-525.
- Stieg PE, Sathi S, Warach S, Le DA, Lipton SA (1999) Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat. *Eur J Pharmacol* 375:115-120.
- Stoilov P, Castren E, Stamm S (2002) Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 290:1054-1065.
- Sugimori H, Yao H, Ooboshi H, Ibayashi S, Iida M (2004) Krypton laser-induced photothrombotic distal middle cerebral artery occlusion without craniectomy in mice. *Brain research Brain research protocols* 13:189-196.

- Sun HS, Doucette TA, Liu Y, Fang Y, Teves L, Aarts M, Ryan CL, Bernard PB, Lau A, Forder JP, Salter MW, Wang YT, Tasker RA, Tymianski M (2008) Effectiveness of PSD95 inhibitors in permanent and transient focal ischemia in the rat. *Stroke* 39:2544-2553.
- Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S, Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T (2012) Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron* 76:410-422.
- Suzuki S, Numakawa T, Shimazu K, Koshimizu H, Hara T, Hatanaka H, Mei L, Lu B, Kojima M (2004) BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: roles in synaptic modulation. *J Cell Biol* 167:1205-1215.
- Svedin P, Hagberg H, Savman K, Zhu C, Mallard C (2007) Matrix metalloproteinase-9 gene knock-out protects the immature brain after cerebral hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 27:1511-1518.
- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH (1999) Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 45:25-32.
- Taghibiglou C, Martin HG, Lai TW, Cho T, Prasad S, Kojic L, Lu J, Liu Y, Lo E, Zhang S, Wu JZ, Li YP, Wen YH, Imm JH, Cynader MS, Wang YT (2009) Role of NMDA receptor-dependent activation of SREBP1 in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *Nat Med* 15:1399-1406.
- Takaguri A, Shirai H, Kimura K, Hinoki A, Eguchi K, Carlile-Klusacek M, Yang B, Rizzo V, Eguchi S (2011) Caveolin-1 negatively regulates a metalloprotease-dependent epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50:545-551.
- Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-726.
- Tashev R, Moura PJ, Venkitaramani DV, Prosperetti C, Centonze D, Paul S, Lombroso PJ (2009) A substrate trapping mutant form of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase prevents amphetamine-induced stereotypies and long-term potentiation in the striatum. *Biol Psychiatry* 65:637-645.
- Tauszig-Delamasure S, Yu LY, Cabrera JR, Bouzas-Rodriguez J, Mermet-Bouvier C, Guix C, Bordeaux MC, Arumae U, Mehlen P (2007) The TrkC receptor induces apoptosis when the dependence receptor notion meets the neurotrophin paradigm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13361-13366.
- Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25:5455-5463.
- Tenneti L, Lipton SA (2000) Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 74:134-142.
- Thiel G, Greengard P, Sudhof TC (1991) Characterization of tissue-specific transcription by the human synapsin I gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3431-3435.
- Tompa P, Buzder-Lantos P, Tantos A, Farkas A, Szilagyi A, Banoczi Z, Hudecz F, Friedrich P (2004) On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem* 279:20775-20785.

- Tornavaca O, Sarro E, Pascual G, Bardaji B, Montero MA, Salcedo MT, Plana M, Lopez-Hellin J, Itarte E, Meseguer A (2011) KAP degradation by calpain is associated with CK2 phosphorylation and provides a novel mechanism for cyclosporine A-induced proximal tubule injury. *PLoS One* 6:e25746.
- Tourette C, Farina F, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Voisin J, Hernandez S, Offner N, Parker JA, Menet S, Kim J, Lyu J, Choi SH, Cormier K, Edgerly CK, Bordiuk OL, Smith K, Louise A, Halford M, Stacker S, Vert JP, Ferrante RJ, Lu W, Neri C (2014) The Wnt receptor Ryk reduces neuronal and cell survival capacity by repressing FOXO activity during the early phases of mutant huntingtin pathogenicity. *PLoS Biol* 12:e1001895.
- Tovar KR, Westbrook GL (1999) The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci* 19:4180-4188.
- Travis J, Pannell R (1973) Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. *Clin Chim Acta* 49:49-52.
- Tremper-Wells B, Vallano ML (2005) Nuclear calpain regulates Ca²⁺-dependent signaling via proteolysis of nuclear Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type IV in cultured neurons. *J Biol Chem* 280:2165-2175.
- Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ (2002) Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J Biol Chem* 277:34295-34302.
- Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O, Hashimoto N (1995) Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery* 37:733-739; discussion 739-741.
- Tu W, Xu X, Peng L, Zhong X, Zhang W, Soundarapandian MM, Balel C, Wang M, Jia N, Lew F, Chan SL, Chen Y, Lu Y (2010) DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* 140:222-234.
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J (2005) A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11:551-555.
- Tymianski M (2011) Emerging mechanisms of disrupted cellular signaling in brain ischemia. *Nat Neurosci* 14:1369-1373.
- Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J Neurosci* 13:2085-2104.
- Uren RT, Turbic A, Wong AW, Klein R, Murray SS, Turnley AM (2014) A novel role of suppressor of cytokine signaling-2 in the regulation of TrkA neurotrophin receptor biology. *J Neurochem* 129:614-627.
- Vaillant AR, Mazzoni I, Tudan C, Boudreau M, Kaplan DR, Miller FD (1999) Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J Cell Biol* 146:955-966.
- Valdez G, Akmentin W, Philippidou P, Kuruvilla R, Ginty DD, Halegoua S (2005) Pincher-mediated macroendocytosis underlies retrograde signaling by neurotrophin receptors. *J Neurosci* 25:5236-5247.

- Valent A, Danglot G, Bernheim A (1997) Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC(NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization. *European journal of human genetics : EJHG* 5:102-104.
- Valenzuela DM, Maisonpierre PC, Glass DJ, Rojas E, Nunez L, Kong Y, Gies DR, Stitt TN, Ip NY, Yancopoulos GD (1993) Alternative forms of rat TrkC with different functional capabilities. *Neuron* 10:963-974.
- Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5578-5582.
- Vaslin A, Naegele-Tollardo S, Puyal J, Clarke PG (2011) Excitotoxicity-induced endocytosis mediates neuroprotection by TAT-peptide-linked JNK inhibitor. *Journal of neurochemistry* 119:1243-1252.
- Verspurten J, Gevaert K, Declercq W, Vandenabeele P (2009) SitePredicting the cleavage of proteinase substrates. *Trends Biochem Sci* 34:319-323.
- Vidaurre OG (2011) Regulación de proteínas en la disyuntiva supervivencia/muerte neuronal en excitotoxicidad e isquemia cerebral: TrkB y PSD-95. Madrid: UAM.
- Vidaurre OG, Gascon S, Deogracias R, Sobrado M, Cuadrado E, Montaner J, Rodriguez-Pena A, Diaz-Guerra M (2012) Imbalance of neurotrophin receptor isoforms TrkB-FL/TrkB-T1 induces neuronal death in excitotoxicity. *Cell Death Dis* 3:e256.
- Vosler PS, Brennan CS, Chen J (2008) Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 38:78-100.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17:497-504.
- Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE (2003) Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 8:592-610.
- Weickert CS, Ligons DL, Romanczyk T, Ungaro G, Hyde TM, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE (2005) Reductions in neurotrophin receptor mRNAs in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 10:637-650.
- Weskamp G, Schlondorff J, Lum L, Becherer JD, Kim TW, Saftig P, Hartmann D, Murphy G, Blobel CP (2004) Evidence for a critical role of the tumor necrosis factor alpha convertase (TACE) in ectodomain shedding of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR). *J Biol Chem* 279:4241-4249.
- Whiteley W, Tseng MC, Sandercock P (2008) Blood biomarkers in the diagnosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 39:2902-2909.
- Wong J, Garner B (2012) Evidence that truncated TrkB isoform, TrkB-Shc can regulate phosphorylated TrkB protein levels. *Biochemical and biophysical research communications* 420:331-335.
- Wong J, Rothmond DA, Webster MJ, Weickert CS (2013) Increases in two truncated TrkB isoforms in the prefrontal cortex of people with schizophrenia. *Schizophrenia bulletin* 39:130-140.

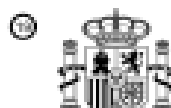
- Wroge CM, Hogins J, Eisenman L, Mennerick S (2012) Synaptic NMDA receptors mediate hypoxic excitotoxic death. *J Neurosci* 32:6732-6742.
- Wu C, Butz S, Ying Y, Anderson RG (1997) Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J Biol Chem* 272:3554-3559.
- Wu C, Lai CF, Mobley WC (2001) Nerve growth factor activates persistent Rap1 signaling in endosomes. *J Neurosci* 21:5406-5416.
- Wu J, Renn CL, Faden AI, Dorsey SG (2013) TrkB.T1 contributes to neuropathic pain after spinal cord injury through regulation of cell cycle pathways. *J Neurosci* 33:12447-12463.
- Xu J, Kurup P, Zhang Y, Goebel-Goody SM, Wu PH, Hawasli AH, Baum ML, Bibb JA, Lombroso PJ (2009) Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci* 29:9330-9343.
- Xu W, Wong TP, Chery N, Gaertner T, Wang YT, Baudry M (2007a) Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. *Neuron* 53:399-412.
- Xu W, Zhou M, Baudry M (2007b) Neuroprotection by Cell Permeable TAT-mGluR1 Peptide in Ischemia: Synergy Between Carrier and Cargo Sequences. *Neuroscientist*.
- Xue Y, Ren J, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X (2008) GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy. *Mol Cell Proteomics* 7:1598-1608.
- Yacoubian TA, Lo DC (2000) Truncated and full-length TrkB receptors regulate distinct modes of dendritic growth. *Nat Neurosci* 3:342-349.
- Yagasaki Y, Numakawa T, Kumamaru E, Hayashi T, Su TP, Kunugi H (2006) Chronic antidepressants potentiate via sigma-1 receptors the brain-derived neurotrophic factor-induced signaling for glutamate release. *J Biol Chem* 281:12941-12949.
- Yamashita K, Kotani Y, Nakajima Y, Shimazawa M, Yoshimura S, Nakashima S, Iwama T, Hara H (2007) Fasudil, a Rho kinase (ROCK) inhibitor, protects against ischemic neuronal damage in vitro and in vivo by acting directly on neurons. *Brain Res* 1154:215-224.
- Yamashita T, Tohyama M (2003) The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* 6:461-467.
- Yamashita T, Tucker KL, Barde YA (1999) Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24:585-593.
- Yin Y, Wang Y, Chen L, Han S, Zhao L, Luo Y, Li J (2013) Tat-collapsin response mediator protein 2 (CRMP2) increases the survival of neurons after NMDA excitotoxicity by reducing the cleavage of CRMP2. *Neurochem Res* 38:2095-2104.
- Yong VW (2005) Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nature reviews Neuroscience* 6:931-944.
- Yoon SO, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chao MV (1998) Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18:3273-3281.

- Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J (1999) A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13496-13500.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Yuen EY, Liu W, Yan Z (2007) The phosphorylation state of GluR1 subunits determines the susceptibility of AMPA receptors to calpain cleavage. *J Biol Chem* 282:16434-16440.
- Zaman V, Nelson ME, Gerhardt GA, Rohrer B (2004) Neurodegenerative alterations in the nigrostriatal system of *trkB* hypomorphic mice. *Exp Neurol* 190:337-346.
- Zeng L, Kuti M, Mujtaba S, Zhou MM (2014) Structural insights into FRS2alpha PTB domain recognition by neurotrophin receptor TrkB. *Proteins* 82:1534-1541.
- Zhang S, Taghibiglou C, Girling K, Dong Z, Lin SZ, Lee W, Shyu WC, Wang YT (2013) Critical role of increased PTEN nuclear translocation in excitotoxic and ischemic neuronal injuries. *J Neurosci* 33:7997-8008.
- Zhang SJ, Steijaert MN, Lau D, Schutz G, Delucinge-Vivier C, Descombes P, Bading H (2007) Decoding NMDA Receptor Signaling: Identification of Genomic Programs Specifying Neuronal Survival and Death. *Neuron* 53:549-562.
- Zhang SJ, Zou M, Lu L, Lau D, Ditzel DA, Delucinge-Vivier C, Aso Y, Descombes P, Bading H (2009) Nuclear calcium signaling controls expression of a large gene pool: identification of a gene program for acquired neuroprotection induced by synaptic activity. *PLoS genetics* 5:e1000604.
- Zheng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiang T, Zhu YC, Zhang C, Duan S, Xiong ZQ (2008) Clathrin-dependent endocytosis is required for TrkB-dependent Akt-mediated neuronal protection and dendritic growth. *J Biol Chem* 283:13280-13288.
- Zheng WH, Kar S, Quirion R (2002) FKHRL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem* 80:1049-1061.
- Zhou L, Xiong J, Lim Y, Ruan Y, Huang C, Zhu Y, Zhong JH, Xiao Z, Zhou XF (2013a) Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. *J Affect Disord* 150:776-784.
- Zhou X, Hollern D, Liao J, Andrechek E, Wang H (2013b) NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors. *Cell death & disease* 4.
- Zonta B, Minichiello L (2013) Synaptic membrane rafts: traffic lights for local neurotrophin signaling? *Front Synaptic Neurosci* 5:9.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E (2001) Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 293:493-498.
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15:871-875.
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD (2005) Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci* 6:615-625.

ANEXOS

Los péptidos neuroprotectores detallados en este trabajo han sido protegidos mediante la solicitud de patentes en la Oficina Española de Patentes y Marcas, lo que hicimos primero para TT1 (patente en fase PCT) y muy recientemente con TFL₄₅₇. Actualmente estamos en fase de escritura de los manuscritos para su publicación

1. Díaz-Guerra, M., **Tejeda, G.S.**, Vidaurre, O.G. “Péptido neuroprotector así como su uso en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y otras patologías del SNC”. N° De Solicitud: PCT/ES2013/070913; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 24-12-2012; 20-12-2013 (Solicitud PCT); Entidad Titular: CSIC/UAM; Países a los que se ha extendido: Oficina Española de Patentes y Marcas.
2. Díaz-Guerra, M., **Tejeda, G.S.**, Vidaurre, O.G. Ayuso, S. “Péptido neuroprotector que aumenta la estabilidad de la proteína Trkb-FL en excitotoxicidad así como su uso en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y otras patologías del SNC”. N° de solicitud: 201431507; País de prioridad: España; Fecha de prioridad: 14-10-2014; Entidad titular: CSIC/UAM; Países a los que se ha extendido: Oficina Española de Patentes y Marcas.



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 479 815**

23 Número de solicitud: 201232015

27 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

24 Fecha de presentación:

24.12.2012

23 Fecha de publicación de la solicitud:

24.07.2014

24 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070913

27 Solicitantes:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)
Serrano, 117
28006 MADRID ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)

27 Inventores:

DÍAZ-GUERRA GONZÁLEZ, Margarita;
SÁNCHEZ TEJEDA, Gonzalo y
GÓMEZ VIDAURRE, Oscar

27 Agente/Representante:

UNGRIA LÓPEZ, Javier

24 Título: **PEPTIDO NEUROPROTECTOR ASÍ COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL SNC**

27 Resumen:

La presente invención hace referencia a un péptido neuroprotector, caracterizado por comprender los 11 aminoácidos C-terminales de TrkB-T1 (residuos 466-476) (SEQ ID NO: 1) y ser capaz de interferir y/o inhibir la unión entre TrkB-T1 y sus moléculas interaccionantes en una neurona y/o célula glial. Así mismo, en la presente invención se protege el uso de dicho péptido neuroprotector para prevenir y/o tratar el daño neuronal en mamíferos causado por una enfermedad cerebrovascular o isquemia cerebral y/o por otra patología del SNC asociada a excitotoxicidad, y/o daño traumático cerebral y/o modular. También se protege una composición farmacéutica o medicamento caracterizado por comprender dicho péptido neuroprotector, así como el uso de los mismos en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares y otras patologías del SNC. Finalmente, se protege el método de obtención de dicho péptido neuroprotector.

ES 2 479 815 A1



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201431507	
Fecha de recepción:	14 octubre 2014, 15:36 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	ES1641.1018	
Solicitante:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes:	2	
País:	ES	
Título:	PÉPTIDO NEUROPROTECTOR QUE AUMENTA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA TRKB-FL EN EXCITOTOXICIDAD ASÍ COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL SNC	
Documentos enviados:	Descripción.pdf (39 p.) Reivindicaciones-1.pdf (2 p.) Dibujos-1.pdf (7 p.) Resumen-1.pdf (1 p.) OLF-ARCHIVE.zip FEERCPT-1.pdf (1 p.) SEQLPDF.pdf (8 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=ENTIDAD PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL - CIF B84821709 - NOMBRE PONS ARIÑO ANGEL - NIF 50634279J,OU=703015345,OU=frmt clase 2 ca,O=FNMT,C=es	
Fecha y hora de recepción:	14 octubre 2014, 15:36 (CEST)	
Codificación del envío:	10:E5:CD:36:86:1D:A1:F5:50:B7:27:2A:4E:C1:9B:4C:8B:83:FD:B2	



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, TURISMO
Y COMERCIO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

(1) MODALIDAD:	PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	<input checked="" type="checkbox"/> 1
(2) TIPO DE SOLICITUD:	PRIMERA PRESENTACIÓN ADICIÓN A LA PATENTE EUROPEA ADICIÓN A LA PATENTE ESPAÑOLA SOLICITUD DIVISIONAL CAMBIO DE MODALIDAD TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA PCT: ENTRADA FASE NACIONAL	<input checked="" type="checkbox"/> 1
(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:	MODALIDAD: N.º SOLICITUD: FECHA SOLICITUD:	
4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:		OEPM, Presentación Electrónica
(5-1) SOLICITANTE 1:	DENOMINACIÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCION LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [] España ES Q0818001D C/ Serrano, 117 Madrid 28 Madrid 28006 España ES [] [] [] 09,00 %
(5-2) SOLICITANTE 2:	DENOMINACIÓN SOCIAL: UNIVERSIDAD PÚBLICA NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL:	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID [] España ES Q0818013A Ciudad Universitaria de Castellanos. Pabellón C.C/ Edificio nº 3 Madrid 28 Madrid 28049

PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: PERSONA DE CONTACTO:		España ES
MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO: INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN:		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
PORCENTAJE DE TITULARIDAD:		050,00 %
(6-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	DÍAZ-GUERRA GONZÁLEZ MARGARITA España ES
(6-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	SÁNCHEZ TERREA GONZALO España ES
(6-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	GÓMEZ VIDALURRI ÓSCAR España ES
(6-4) INVENTOR 4:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: NIF/NIE/PASAPORTE:	AYUSO DOLADO SARA España ES
(7) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		PÉPTIDO NEUROPROTECTOR QUE AUMENTA LA ESTABILIDAD DE LA PROTEÍNA TRER-FL EN EXCITOTOXICIDAD ASÍ COMO SU USO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES Y OTRAS PATOLOGÍAS DEL SNC
(8) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:		SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(9) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACCELERADO DE CONCESIÓN:		SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(10) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:		SI NO <input checked="" type="checkbox"/>
(11) DEPÓSITO:		
REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. I):		

